

Die Erzeugung und Relaxation von Singulett-Sauerstoff in homogenen Lösungen sowie Lipid- und Zellsuspensionen



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

der Naturwissenschaftlichen Fakultät II - Physik
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Roland Engl

aus
Ingolstadt

Februar 2003

Angaben zur Promotion

Promotionsgesuch eingereicht am: 05. Februar 2003

Tag der mündlichen Prüfung: 08. April 2003

Diese Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Max Maier

Prüfungsausschuß:

Vorsitzender: Prof. Dr. Andreas Schäfer

1. Gutachter: Prof. Dr. Max Maier

2. Gutachter: PD Dr. Wolfgang Bäumler

weiterer Prüfer: Prof. Dr. Dietmar Göritz

*Ohne ein genaues Studium der Chemie und Physik
werden die Physiologie und Medizin
in ihren wichtigsten Aufgaben [...]
kein Licht erhalten.*

JUSTUS FREIHERR VON LIEBIG (1803-1873)

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	1
1 Photochemotherapie	5
1.1 Historisches zur Photochemotherapie	5
1.2 Ausgewählte Photochemotherapien	9
1.2.1 PUVA-Therapie	9
1.2.2 Photodynamische Therapie	12
1.3 Anforderungen an ein optimales Photochemotherapeutikum	13
1.4 Primäre Prozesse bei der Photosensibilisierung	15
2 Singulett-Sauerstoff	19
2.1 Strahlender intermolekularer Energietransfer	20
2.2 Nichtstrahlende intermolekulare Energietransfers	20
2.2.1 Dexter-Prozeß	20
2.2.1.1 Allgemeines	20
2.2.1.2 Erzeugung von Singulett-Sauerstoff	21
2.2.2 Förster-Prozeß	23
2.2.2.1 Allgemeines	23
2.2.2.2 Relaxation von Singulett-Sauerstoff	23
2.3 Spektroskopie	24
2.4 Ratengleichungssystem für die Erzeugung und Relaxation von Singulett-Sauerstoff	26

2.4.1	Allgemeiner Fall: $k_{\Delta T_1} > 0$	29
2.4.2	Spezieller Fall: $k_{\Delta T_1} = 0$	29
2.4.3	Beispiele	30
2.5	Quantenausbeute	32
2.6	Motivation dieser Arbeit	35
3	Experimentelle Methoden	37
3.1	Generierung von Singulett-Sauerstoff in homogenen Lösungen	37
3.1.1	8-Methoxypsoralen	38
3.1.2	9-acetoxy-2,7,12,17-tetrakis-(β -methoxyethyl)-Porphycen (ATMPn)	41
3.1.3	Protoporphyrin IX	43
3.1.4	2,4,5,7-tetraiodo-3',4',5',6'-Tetrachlorfluorescein (Bengalrosa) . .	45
3.1.5	Indocyaningrün	47
3.2	Generierung von Singulett-Sauerstoff in heterogenen Suspensionen . . .	49
3.2.1	Photofrin	50
3.2.2	Lipidsuspensionen	52
3.2.3	Zellsuspensionen	53
3.3	Quenchersubstanzen	53
3.3.1	Verwendung von Quenchern in homogenen Lösungen	54
3.3.2	Verwendung von Quenchern in Lipidsuspensionen	54
3.3.3	Verwendung von Quenchern in Zellsuspensionen	55
3.4	Herstellung und Bestimmung der Sauerstoff-Konzentration in homogenen Lösungen	55
3.4.1	Herstellung eines bestimmten Sauerstoffgehalts	55
3.4.2	Polarographische Messung des Sauerstoffpartialdampfdrucks . .	56
3.4.3	Faseroptische Messung des Sauerstoffgehalts	56
3.5	Kolokalisationsaufnahmen	57
3.5.1	Aufbau einer Zelle	58
3.5.2	Verwendete Organellfarbstoffe	59

3.5.3	Fluoreszenzmikroskopie	60
3.5.4	Generierung von Falschfarbenbildern und Fluoreszenzintensitätsprofilen	62
3.6	Zellvitalitätsmessung	62
3.7	Detektion der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz und Meßwerterfassung	63
4	Ergebnisse und Diskussion	67
4.1	Lumineszenz von Singulett-Sauerstoff in homogenen Lösungen	67
4.1.1	8-Methoxypsoralen	70
4.1.1.1	Variation der Sauerstoff-Konzentration	70
4.1.1.2	Variation der 8-MOP-Konzentration	71
4.1.1.3	Variation der Natriumazid-Konzentration	72
4.1.1.4	Variation der Histidin-Konzentration	73
4.1.1.5	Effizienz der Triplett-T ₁ -Deaktivierung durch Sauerstoff	75
4.1.2	ATMPn	78
4.1.2.1	Variation der Sauerstoff-Konzentration	78
4.1.2.2	Variation der ATMPn-Konzentration	79
4.1.2.3	Variation der Natriumazid-Konzentration	80
4.1.2.4	Effizienz der Triplett-T ₁ -Deaktivierung durch Sauerstoff	81
4.1.3	Bengalrosa	84
4.1.3.1	Variation der Sauerstoff-Konzentration	84
4.1.3.2	Abschätzung der Raten des Energieübertrags bzw. des Ladungstransfers von Bengalrosa auf Sauerstoff innerhalb des Komplexes	87
4.1.3.3	Variation der Bengalrosa-Konzentration	89
4.1.3.4	Variation der Natriumazid-Konzentration	91
4.1.3.5	Effizienz der Triplett-T ₁ -Deaktivierung durch Sauerstoff	93
4.1.3.6	Quantenausbeute	94
4.1.4	Vergleich einiger experimentell bestimmter Ratenkonstanten . .	97
4.1.5	Protoporphyrin IX	98

4.1.5.1	Variation der Sauerstoff-Konzentration	98
4.1.5.2	Variation der PPIX-DME-Konzentration	99
4.1.5.3	Variation der Natriumazid-Konzentration	101
4.1.5.4	Quantenausbeute	103
4.1.6	Indocyaningrün	105
4.2	Lumineszenz von Singulett-Sauerstoff in Lipidsuspensionen	110
4.2.1	Variation der Photofrin-Konzentration	113
4.2.2	Quencherexperimente	115
4.2.2.1	Variation der Natriumazid-Konzentration	115
4.2.2.2	Variation der Zeit zwischen der Zugabe von Natrium- azid und der Lumineszenzmessung	117
4.2.2.3	Variation der Histidin-Konzentration	120
4.2.2.4	Variation der Zeit zwischen der Zugabe von Histidin und der Lumineszenzmessung	122
4.2.2.5	Wärmebadbehandlung	123
4.3	<i>In vitro</i> Experimente	126
4.3.1	Subzelluläre Lokalisation von Photofrin	126
4.3.1.1	90 Minuten Inkubationszeit	126
4.3.1.2	24 Stunden Inkubationszeit	130
4.3.2	Lumineszenz von Singulett-Sauerstoff in Zellsuspensionen	133
4.3.2.1	HT29 in H ₂ O-PBS	133
4.3.2.2	HT29 in D ₂ O-PBS	136
4.3.3	Zellvitalität	139
4.3.3.1	90 Minuten Inkubationszeit	139
4.3.3.2	24 Stunden Inkubationszeit	140
4.3.3.3	Quencher	142
Zusammenfassung		143
	Homogene Lösungen	143
	Lipidsuspensionen	145

<i>In vitro</i> Experimente	145
A Präparation der Zellsuspensionen	147
B Henrysches Gesetz	149
C Meßprinzipien zur Bestimmung des Sauerstoffgehalts	153
C.1 Sauerstoff-Polarographie	153
C.2 Faseroptische Messung der Sauerstoff-Konzentration	154
Literaturverzeichnis	155
Danksagung	173

Einleitung

Die Photochemotherapie bezeichnet das Einbringen von lichtsensibilisierenden Substanzen in den Körper eines Menschen und die anschließende Bestrahlung mit Licht geeigneter Wellenlänge zur Erzielung von therapeutischen Effekten. Sie hielt ihren Einzug in die Reigen der medizinischen Therapien weniger als Höhepunkt eines gezielten wissenschaftlichen Suchens nach einer neuen Behandlungsform bestimmter Krankheiten, sondern eher basierend auf zum Teil Jahrtausende alten Erfahrungen. Deshalb wurden erste Photochemotherapien bereits klinisch eingesetzt, als noch ein relativ grobes Wissen über deren Wirkprinzipien bestand. Dabei war man sich jedoch schon relativ früh für einen Teil der Photochemotherapien, nämlich der photodynamischen Therapie, der Notwendigkeit der Anwesenheit von molekularem Sauerstoff bewußt. Weitere Forschung zeigte dann, daß der Sauerstoff, der durch den Energieübertrag vom Triplett- T_1 -Zustand eines Photosensibilisators in den elektronischen $^1\Delta_g$ -Zustand angeregt wurde, der sogenannte Singulett-Sauerstoff, bei der photodynamischen Therapie eine zentrale Position einnimmt.

Um die jeweilige Rolle des Singulett-Sauerstoffs innerhalb einer betrachteten Photochemotherapie näher zu bestimmen, bietet sich zunächst die Untersuchung der photophysikalischen Grundlagen der Erzeugung durch den jeweiligen Photosensibilisator sowie die Beobachtung der Relaxation des Singulett-Sauerstoffs an. Letztere ist entscheidend für dessen Wirkung, da bei größerer Lebensdauer eine stärkere Schädigung des Gewebes zu erwarten ist. Hierzu ist aufgrund der Variierbarkeit der Konzentrationen an Photosensibilisator und Sauerstoff das denkbar einfachste System, bestehend aus einer homogenen Lösung von Photosensibilisator und Sauerstoff in einem Lösungsmittel, zu wählen. Davon ausgehend ist es dann möglich, sich schrittweise komplizierteren Systemen, wie etwa lebenden Zellen, zu nähern.

Bei der Untersuchung der photophysikalischen Grundlagen der Erzeugung und Relaxation von Singulett-Sauerstoff kommt dessen Detektion eine zentrale Rolle zu. Hierzu bieten sich zwei prinzipielle Verfahrensweisen an: zum einen der indirekte Nachweis durch Zugabe von Substanzen, welche durch den hochreaktiven Singulett-Sauerstoff auf möglichst definierte Weise chemisch verändert werden und anschließender Detektion dieser Reaktionsprodukte, zum anderen der direkte Nachweis durch die Detektion

der Lumineszenz des Singulett-Sauerstoffs bei 1270 nm. Dieser direkte Nachweis ist besonders erstrebenswert, da der indirekte, chemische Nachweis oftmals keine eindeutigen Ergebnisse liefert. Die direkte Detektion des Singulett-Sauerstoffs stellt jedoch aufgrund der Wellenlänge im nahen Infrarot bei 1270 nm und vor allem aufgrund der sehr geringen Lumineszenzquantenausbeute meßtechnisch ein herausforderndes Unterfangen dar, wobei der im Rahmen der vorliegenden Arbeit eingesetzte Photomultiplier eine herausragende Verbesserung verspricht. Durch die hohe Sensitivität und das hervorragende Signal/Rausch-Verhältnis des verwendeten Photomultipliers wird in Verbindung mit einer schnellen Zählleinrichtung zum Einzelphotonenzählen die zeitaufgelöste Lumineszenzspektroskopie an Singulett-Sauerstoff entscheidend erleichtert.

Dadurch ist es nun zunächst möglich, in homogenen Lösungen sowohl die Erzeugung von Singulett-Sauerstoff durch eine Reihe von klinisch eingesetzten Photosensibilisatoren, als auch dessen Relaxation zu untersuchen, und zwar bei Variation der Konzentrationen an Photosensibilisator, Sauerstoff und Quencher. Letzteres bezeichnet Substanzen, die die Lebensdauer des Singulett-Sauerstoffs verkürzen und so zum Nachweis von Singulett-Sauerstoff, hauptsächlich im Rahmen von indirekten Nachweismethoden, verwendet werden. Vor allem die in dieser Arbeit durchgeführte Variation der Sauerstoff-Konzentration, die einen direkten Einfluß auf die Effizienz der Singulett-Sauerstoff-Generierung hat, sowie die Messung der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz bei Sauerstoff-Konzentrationen wie sie auch *in vivo* herrschen, stellt ein Novum dar. Um die Auswirkungen von Variationen der Konzentrationen an Photosensibilisator, Sauerstoff und Quencher besser erfaßbar zu machen, ist deuterierten Lösungsmitteln wie schwerem Wasser oder deuteriertem Ethanol der Vorzug zu geben, da in diesen die Singulett-Sauerstoff-Abklingdauer größer ist als in den entsprechenden nicht-deuterierten und somit die zeitaufgelöste Detektion der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz erleichtert wird.

Die theoretische Beschreibung der Erzeugung und Relaxation von Singulett-Sauerstoff erfolgt durch ein Differentialgleichungssystem, das – anders als das bisher gültige Standardmodell – nicht nur die unterschiedlichen Relaxationskanäle des energieübertragenden Triplett-T₁-Zustandes des Photosensibilisators sowie des Singulett-Sauerstoffs betrachtet, sondern auch die elektronische Anregung des Photosensibilisators in den Triplett-T₁-Zustand durch den Rücktransfer von Energie von Singulett-Sauerstoff berücksichtigt. Dieser Prozeß ist ebenfalls möglich, wenn der ¹Δ_g-Zustand des Sauerstoffs und der Triplett-T₁-Zustand des Photosensibilisators energetisch nahe beieinander liegen, was für eine hohe Effizienz eines Singulett-Sauerstoff-Generators nötig ist. Die genaue Kenntnis der beteiligten physikalischen Abläufe ist die Voraussetzung für das Verständnis des Verhaltens von Singulett-Sauerstoff in zellulärer Umgebung.

Aufgrund der verbesserten experimentellen Bedingungen ist es im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals möglich, den spektroskopischen Nachweis von Singulett-Sauerstoff *in vitro*, das heißt hier in Suspensionen mit lebenden Zellen, zu erbringen.

Um sich jedoch ausgehend von dem einfachen System, welches die homogenen Lösungen darstellen, den komplizierten Verhältnissen in Zellen anzunähern, wird die Erzeugung und Relaxation von Singulett-Sauerstoff in Lipidsuspensionen untersucht, wobei sich hierzu die Verwendung von Phosphatidylcholin, eines in Zellen häufig vorkommenden Lipids, anbietet. Da die Abklingzeit der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz spezifisch für die jeweilige Umgebung des Singulett-Sauerstoffs ist, und in der bisherigen Literatur lediglich eine Abschätzung der Singulett-Sauerstoff-Abklingzeit in Phosphatidylcholin existiert, ist die erstmalige Bestimmung dieser als wesentlicher Schritt für ein späteres Verständnis von Singulett-Sauerstoff-Abklingzeiten in Zellsuspensionen anzusehen.

Die Schwierigkeiten bei der Detektion von intrazellulärem Singulett-Sauerstoff sind immens: Die zu erwartende Lumineszenzintensität ist nicht nur wegen der sehr geringen Lumineszenzquantenausbeute, sondern zusätzlich wegen der geringen Gesamtmenge an intrazellulärem Photosensibilisator sehr klein. Desweiteren ist die erwartete Abklingzeit von intrazellulärem Singulett-Sauerstoff aufgrund der intrazellulären Proteine, die starke Quencher darstellen, sehr kurz. Hierzu ist jedoch anzumerken, daß Lipide, bei welchen es sich um wesentlich weniger starke Quencher handelt, einen weiteren Hauptbestandteil von Zellen darstellen. Somit stellt die längere Singulett-Sauerstoff-Abklingzeit in Lipidumgebung eine Möglichkeit des Nachweises von intrazellulärem Singulett-Sauerstoff dar.

Zur eindeutigen Interpretation von gemessenen Singulett-Sauerstoff-Abklingzeiten in Zellsuspensionen sind zusätzlich weitere Erkenntnisse notwendig. Diese resultieren zum einen aus der Bestimmung der Lokalisation des Photosensibilisators innerhalb der betrachteten Zellen, zum anderen aus der Bestimmung der Zellvitalität, das heißt des Verhältnisses von lebenden zur Gesamtzahl an betrachteten Zellen, vor und nach der Messung der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz. Dadurch kann geklärt werden, ob der Singulett-Sauerstoff aufgrund der subzellulären Lokalisation des Photosensibilisators Kontakt zum zelläußeren Medium haben kann, oder aber aufgrund einer vorhandenen Zellschädigung zelläußeres Medium in die betrachteten Zellen gelangen kann und so ein Kontakt zwischen zelläußerem Medium und intrazellulärem Singulett-Sauerstoff hergestellt wird.

Die in der bisherigen Literatur gemachten Versuche, mit Zellsuspensionen gemessene Singulett-Sauerstoff-Abklingzeiten eindeutig zu interpretieren, können als weitestgehend gescheitert betrachtet werden. Deshalb stellt der Versuch, durch die Korrelation der Ergebnisse aus der Bestimmung der subzellulären Lokalisation des Photosensibilisators mit Messungen der Singulett-Sauerstoff-Abklingdauer sowie der Zellvitalität einen zweifelsfreien spektroskopischen Nachweis von intrazellulärem Singulett-Sauerstoff *in vitro* zu erbringen, ein absolutes Novum dar.

Kapitel 1

Photochemotherapie

Photosensibilisierung im allgemeinen bezeichnet einen Prozeß, durch welchen ein System durch eine exogene Substanz sensibel gegenüber Licht wird [L86]. Daraus folgt, daß ein Photosensibilisator als eine Substanz definiert werden kann, deren Einbringung in ein bestrahltes System bestimmte Effekte induziert, welche ohne diese Substanz nicht aufgetreten wären [L86]. Die Benutzung eines exogenen Photosensibilisators zur Erzielung eines therapeutischen Effektes über die Absorption von Licht wird als Photochemotherapie bezeichnet [DH91].

1.1 Historisches zur Photochemotherapie

Die Verwendung von exogenen Photosensibilisatoren und Licht zur Behandlung von verschiedenen Erkrankungen ist mehr als 3000 Jahre alt. Bereits 1400 v. Chr. wurden erstmals Psoralene aus Samen der Pflanze *Psoralea corylifolia* von Hindus zur Repigmentierung der Haut bei Vitiligo¹ eingesetzt [DH91]. Ab dem 12. Jahrhundert unserer Zeitrechnung benutzten die Ägypter Psoralene aus einer anderen Pflanze, *Anmī Majus*, zur Behandlung von Leukoderm² [DH91, BS84]. Jedoch dauerte es bis zum Anfang des 20. Jahrhunderts, bis die Photosensibilisierung erstmals auf wissenschaftliche Art und Weise untersucht wurde [DH91, SDA01], und zwar von einem Medizinstudenten namens Oskar Raab im Rahmen seiner Doktorarbeit bei Prof. Herman von Tappheimer, Direktor des pharmakologischen Institutes in München. Durchgeführt wurden dabei *in vitro* Experimente, bei denen u.a. die Wirkung von Acridin auf Malaria-Erreger getestet wurde [R00]. Im Jahre 1903 wurden von H. von Tappheimer und A. Jesionek

¹Erkrankung der Haut und der Schleimhäute, die sich durch weiße, pigmentfreie und langsam größer werdende Flecken auszeichnet [P94]

²Fleckförmige Hypo- oder Depigmentierung der Haut im Rahmen von entzündlichen Hautkrankheiten [P94]

erstmals klinische Versuche publiziert, bei denen Eosin als Photosensibilisator zur gezielten Behandlung von Hautkrebs und einigen anderen Erkrankungen verwendet wurde [TJ03]. Im Jahre 1907 wurde dann von H. von Tappheimer im Rahmen einer Buchveröffentlichung der Begriff „Photodynamische Therapie“ (PDT) geprägt, um speziell die sauerstoff-abhängige Photochemotherapie zu beschreiben [TJ07]. Spätere Untersuchungen zeigten jedoch, daß die therapeutischen Effekte lediglich für eine bestimmte Zeit und auch nur auf die oberflächlichen Anteile der Läsionen beschränkt waren [SDA01]. Deshalb stellte man im Jahre 1909 die klinischen Versuche mit Photosensibilisatoren wie Acridin, Chinidin und Eosin ein [SDA01, T09].

Auf der Suche nach neuen Photosensibilisatoren wurden dann von Walter Hausmann im Jahre 1911 erstmals Resultate u. a. über die photosensibilisierende Wirkung von Hämatoporphyrin auf rote Blutkörperchen und auf Mäuse veröffentlicht [H11]. Letztere zeigten, dem Sonnenlicht ausgesetzt, typische Symptome wie die Bildung von Ödemen³, Erythema⁴ und Nekrosen⁵ [H11]. Den ersten Beweis, daß Porphyrine auch im Menschen als photodynamische Agenzien wirken können, lieferte Friedrich Meyer-Betz am 12. Oktober 1912 in einem heroischen Selbstversuch, bei dem er sich 200 mg Hämatoporphyrin selbst injizierte und eine kleine Fläche auf seinem Unterarm mit Licht bestrahlte. Dies verursachte schwere Schmerzen und bereits nach Minuten bildete sich eine Schwellung im Bereich des belichteten Areals. Bis dato unbekannt war die Tatsache, daß die intravenöse Applikation von Hämatoporphyrin zu einer Lichtsensibilisierung der gesamten Hautoberfläche (generalisierte kutane Photosensibilisierung) führt, was F. Meyer-Betz leidvoll erfahren mußte, als es nach Sonnenlichtexposition zu massiven Schwellungen im Bereich der Hände und des Kopfes kam (siehe Abbildung 1.1).



Abbildung 1.1: F. Meyer-Betz vor (links) und nach seinem Selbstversuch und Sonneneinstrahlung (rechts) [M13]

³Schwellungen [P94]

⁴entzündlichen Rötungen [P94]

⁵Veränderungen des Gewebes aufgrund des Absterbens von Zellen [P94]

Diese generalisierte Photosensibilisierung durch Hämatoporphyrin hielt insgesamt zwei Monate an [M13]. Hämatoporphyrin wurde in Deutschland im Jahre 1931 unter dem Namen „Photodyn“ als Medikament klinisch zugelassen, jedoch zur Behandlung von Patienten mit psychiatrischen Störungen [SDA01]. Im Jahre 1948 wurden schließlich Porphyrine wegen ihrer guten Akkumulation in Tumoren für die photodynamische Therapie vorgeschlagen [FWM48], was im Jahre 1955 aufgrund des Auftretens von schweren phototoxischen Reaktionen wieder verworfen wurde [RWF55]. Im Jahre 1978 fanden T. J. Dougherty und Mitarbeiter jedoch, daß Di-Hämatoporphyrin-Ether sowie das Oligomerengemisch Hämatoporphyrin-Derivat sich besser für die photodynamische Therapie eignen als Porphyrine [DKG78].

Mittlerweile ist u. a. eine Variante des Hämatoporphyrin-Derivats, Photofrin[®], zur systemischen photodynamischen Therapie einiger onkologischer Indikationen in verschiedenen Staaten zugelassen [SDA01]. Für einige dermatologische Indikationen wurde kürzlich 5-Aminolävulinsäure (5-ALA), die im Jahre 1990 erstmalig zur topischen⁶ Behandlung einiger maligner⁷ Tumore und prä-maligner Gewebeveränderungen der Haut eingesetzt wurde [KPP90] und innerhalb von Zellen erst zum eigentlichen Photosensibilisator Protoporphyrin IX metabolisiert werden muß, als Levulan Kerastic[®] in den Vereinigten Staaten als Medikament klinisch zugelassenen [SDA01]. Jedoch ist Photofrin[®] keine Reinsubstanz und verursacht eine langanhaltende Photosensibilisierung der Haut [RBP87]. Daneben werden nicht bei allen mit 5-Aminolävulinsäure behandelten Hauterkrankungen genügend Protoporphyrin IX metabolisiert, um alle erkrankten Zellen abzutöten [KSE97]. Deshalb liegt ein Hauptaugenmerk in der Forschung immer noch der Entwicklung von effektiveren und spezifischeren Photosensibilisatoren, wie bereits in [DH91] vermerkt.

Als Ausblick für die Zukunft soll hierzu ein Originalzitat nach M. D. Daniell und J. S. Hill dienen [DH91]: „*With a better understanding of the photophysics, photochemistry and photobiology of photodynamic therapy we should see marked improvement in the clinical efficacy of this treatment modality, which had its beginning in prehistory, and be able to identify a clear indication for its use in the adjuvant therapy of cancer.*“

Jedoch fanden auch Photosensibilisatoren für nicht-sauerstoff-abhängige Photochemotherapien Eingang in die klinische Verwendung. Z. B. wurde für die Samen der von den Ägyptern ab dem 12. Jahrhundert verwendeten Pflanze *Anmi Majus* (s. o.) im Jahre 1947 der Gehalt von drei Psoralenderivaten nachgewiesen [BS84]. Darunter befand sich auch 8-Methoxypsoralen, welches in den 50er Jahren des 20. Jahrhunderts kommerziell verfügbar wurde [BS84] und mittlerweile weit verbreitet ist zur klinischen Behandlung u. a. der Psoriasis⁸ [JYT93] mit der PUVA-Therapie (siehe Kapitel 1.2.1). Allerdings sei

⁶oberflächlichen

⁷bösartiger

⁸Schuppenflechte [P94]

bereits an dieser Stelle erwähnt, daß auch im Rahmen der PUVA-Therapie Singulett-Sauerstoff erzeugt wird, jedoch scheint ihm hier lediglich eine Nebenrolle zuzufallen (s. u.).

Abschließend zeigt Tabelle 1.1 noch eine Auswahl an Photosensibilisatoren mit deren Handelsnamen sowie dem jeweiligen Status der Medikamentenzulassung.

Handelsname	Substanz	Status	Staat(en)
Photofrin	Hämatoporphyrinderivat (HPD)	zugelassen	USA, Europa
Levulan Kerastick	5-Aminolävulinsäure (5-ALA)	zugelassen	USA
Verteporfin	Benzoporfinderivat	zugelassen	USA, Europa
Metvix	5-ALA-Methylester	zugelassen	Schweden
Spectrilla	5-ALA	Phase III	(Europa)
PCI-0123	Lutetium Texaphyrin	Phase III	–
ATMPn	Porphycen	Phase II	–
Foscan	Mesa-Tetra-Hydroxy-Phenylchlorin	Phase II	–
Bergapten	5-Methoxypsoralen (5-MOP)	zugelassen	?
Xanthotoxin	8-Methoxypsoralen (8-MOP)	zugelassen	?
ICG	Indocyaningrün-Natriumiodid (ICG-NaI)	zugelassen	USA, Europa

Tabelle 1.1: Auswahl an Photosensibilisatoren mit Handelsnamen und Zulassungsstatus

1.2 Ausgewählte Photochemotherapien

1.2.1 PUVA-Therapie

Nach [PFT74] leiden etwa ein bis drei Prozent der Weltbevölkerung an Psoriasis. Diese Krankheit zeichnet sich durch eine überstürzte Epidermisbildung⁹ aus, bei der die Bildung der Keratinozyten¹⁰ bis auf das 10fache gesteigert ist und deren Wanderung von der sog. Basalschicht der Oberhaut bis zur Hornschicht lediglich etwa vier Tage dauert, im Gegensatz zu etwa 28 Tagen bei gesunden Menschen [P94] (siehe Abbildung 1.2).

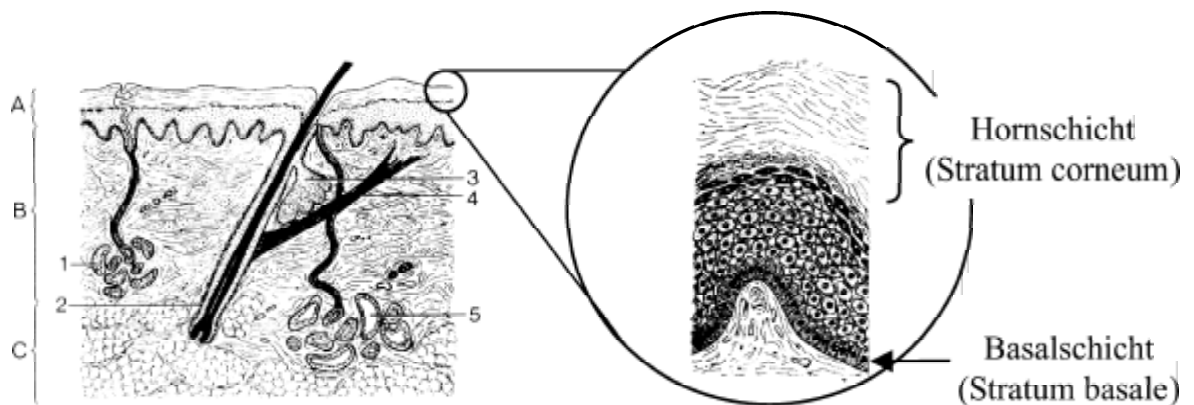


Abbildung 1.2: Schnitt durch die menschliche Haut (links) mit vergrößerter Darstellung der Oberhaut (rechts) nach [P94]: A: Oberhaut (Epidermis), B: Lederhaut (Korium), C: Unterhaut (Subkutis); 1,5: Schweißdrüsen, 2: Haar, 3: Talgdrüse, 4: Haarbalg

Die Psoriasis zeichnet sich aus durch entzündlich gerötete, mit Schuppen bedeckte Herde auf der Haut. Diese Herde können punktförmig klein bis handflächengroß sein, wobei durch das Zusammenwachsen von Herden schließlich die gesamte Hautoberfläche betroffen sein kann. Eine mögliche Behandlungsform der Schuppenflechte stellt die PUVA-Therapie dar. Darunter versteht man die in der Regel topische Verabreichung von Psoralen oder eines seiner Derivate (d. h. der Photosensibilisator wird auf die Haut, z. B. als Salbe, aufgetragen) in Kombination mit Bestrahlung durch langwelliges ultraviolettes Licht (UVA).

Die bei der PUVA-Therapie auftretenden photosensibilisierenden Reaktionen mit Biomolekülen samt den daraus resultierenden zellulären sowie therapeutischen Effekten lassen sich in zwei Gruppen einteilen, je nachdem ob Sauerstoff bei den Reaktionen beteiligt ist oder nicht (siehe Abbildung 1.3 auf Seite 10).

⁹Bildung der Oberhaut [P94]

¹⁰Zellen der Epidermis [P94]

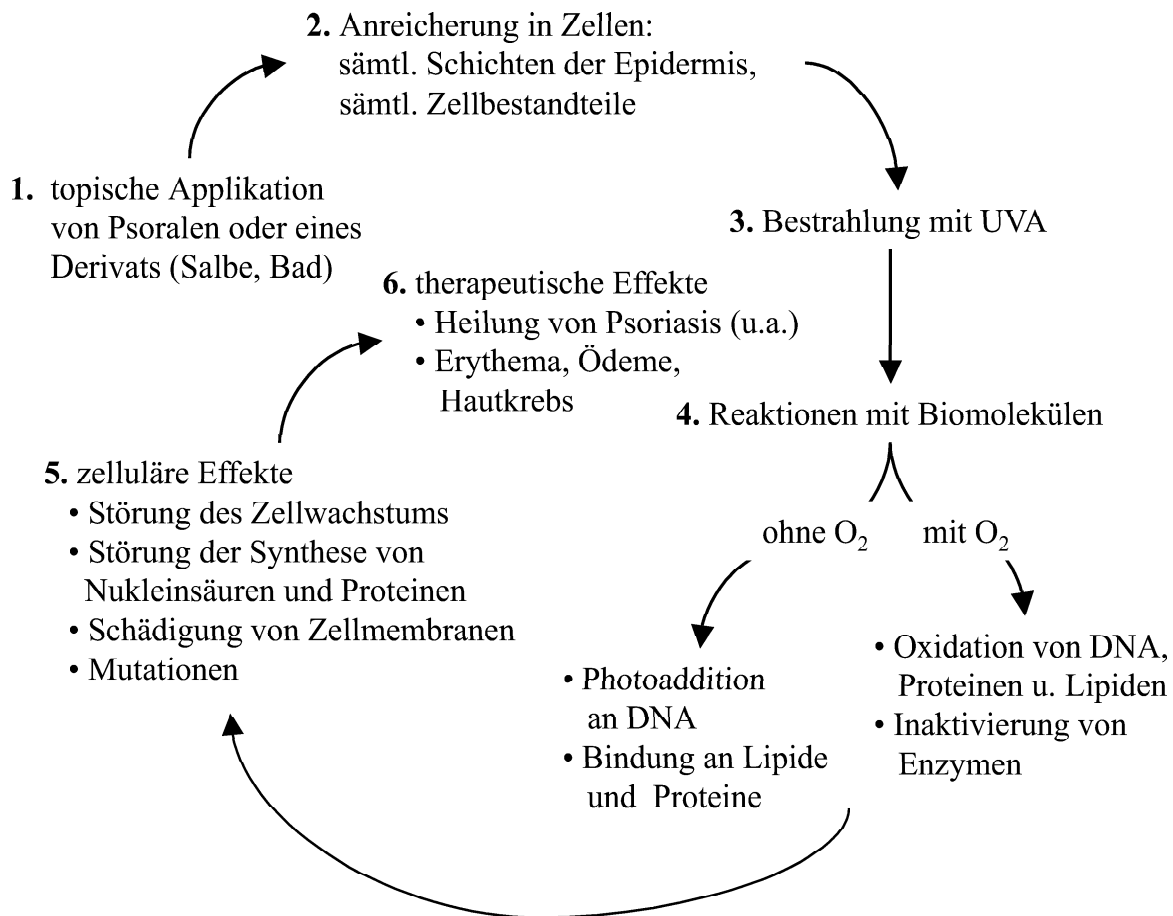


Abbildung 1.3: Photochemische Effekte bei der PUVA-Therapie [P91]

Die Beteiligung von Singulett-Sauerstoff am therapeutischen Erfolg bei der PUVA-Therapie ist umstritten: In der älteren Literatur wird jegliche Sauerstoff-Beteiligung streng verneint und die Photosensibilisierung alleine der Fähigkeit zugeschrieben, Photoadditionsreaktionen mit DNA einzugehen [MR69] (Typ I-Reaktion). Neuere Werke schließen die Beteiligung von Singulett-Sauerstoff an der Photosensibilisierung nicht mehr aus [PJ84, BG87, G94b]. Zumindest aber werden der Produktion von Singulett-Sauerstoff eine Reihe von Nebenwirkungen zugeschrieben, darunter die Bildung von Ödemen¹¹ und Erythema¹² und sogar ein Beitrag zur Entstehung von Hautkrebs [JP83, PJ84].

Ein für die PUVA-Therapie von Psoriasis und einiger anderer Hautkrankheiten sehr verbreitetes Psoralen-Derivat ist das 8-Methoxypsoralen (Handelsname Xanthotoxin) [JYT93], dessen chemische Struktur u. a. in Abbildung 1.4 auf Seite 11 gezeigt ist.

¹¹Schwellungen [P94]

¹²Rötungen [P94]

Speziell für dieses Psoralen-Derivat wurde zusätzlich zu den oben genannten Photosensibilisierungsreaktionen noch eine Photoadduktbildung von 8-Methoxypsoralen mit der DNA mediiert durch Singulett-Sauerstoff diskutiert [HWS89].

Nach der Verabreichung ist 8-Methoxypsoralen im Zellkern und im Zytoplasma in Zellen sämtlicher Schichten der Oberhaut nachzuweisen [M86]. Lebende Zellen werden von Psoralenen, insbesondere von 8-Methoxypsoralen, sehr schnell innerhalb von Minuten penetriert und sind in allen Zellbestandteilen zu finden [MSK82]. Zum besseren Verständnis sei hier noch die Typ I-Reaktion der kovalenten Bindung zwischen 8-Methoxypsoralen und Pyrimidinresten der DNA (nach [G94a] ist das Basenpaar Adenin/Thymin die ideale Stelle für eine kovalente Bindung) explizit gezeigt (siehe Abbildung 1.4). Nach der Interkalation des 8-Methoxypsoralen-Moleküls in die DNA folgt durch Absorption eines Photons die Monoadduktbildung (1) sowie nach Absorption eines zweiten Photons die Kreuzvernetzung (2). Beiden chemischen Reaktionen geht durch die Absorption des Photons die Aktivierung einer Doppelbindung voraus.

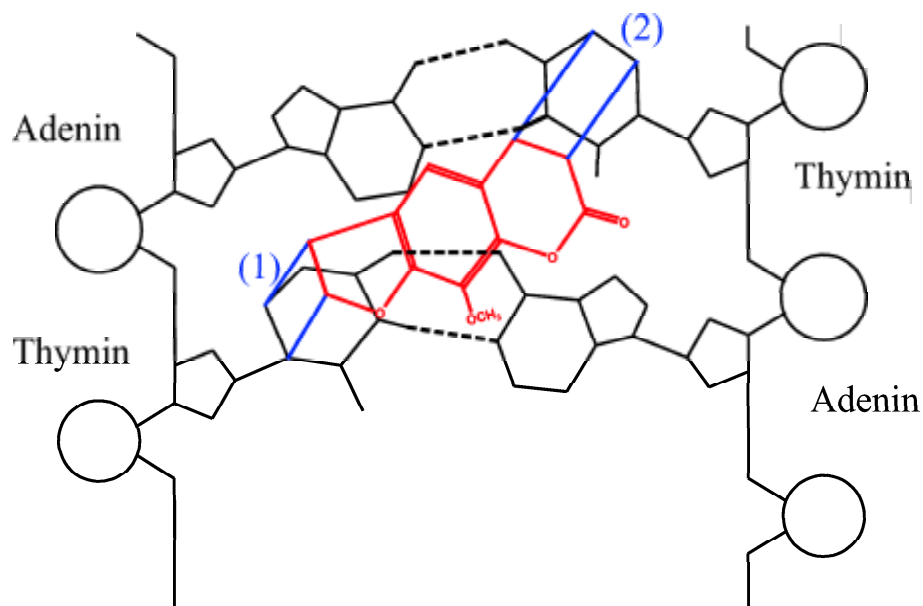


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung zweier Adenin/Thymin-Basenpaare der DNA mit einem kovalent gebundenen 8-Methoxypsoralen-Molekül (rot); (1) Monoadduktbildung, (2) Kreuzvernetzung [G94a, BS84]; gestrichelt dargestellt: Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Einzelsträngen

1.2.2 Photodynamische Therapie

Hält man sich streng an die Definition der „Photodynamischen Therapie“ durch H. von Tappheimer, dann handelt es sich speziell um die Anwendung der sauerstoff-abhängigen Photosensibilisierung [TJ07]. Behandelt werden dadurch hauptsächlich maligne Tumore und prä-maligne Gewebeveränderungen, und zwar z. B. durch die Verwendung von Photofrin® bei der systemischen photodynamischen Therapie oder durch 5-Aminolävulinsäure bei der topischen. Nach der Verteilung des Photosensibilisators, entweder im gesamten Organismus oder aber im Areal der lokalen Verabreichung, folgt eine mehr oder weniger selektive Anreicherung im erkrankten Gewebe (das Verhältnis $\frac{c(\text{Tumorgewebe})}{c(\text{Normalgewebe})}$ beträgt etwa 3:1). Die für das Gefälle an Photosensibilisator-Konzentration zwischen erkranktem und gesundem Gewebe verantwortlichen Mechanismen sind nicht vollständig verstanden, jedoch dürften bestimmte Eigenschaften von tumorösem Gewebe wie etwa ein erniedrigter pH-Wert oder aber durchlässigere Blutgefäße [DGH98] wie auch die Hydrophobizität des Photosensibilisators [ZPC01] eine Rolle spielen.

Durch Bestrahlung des zu behandelnden Areals mit Laserlicht bzw. inkohärentem Licht aus Lampen oder LEDs [B01a] werden Sauerstoffradikale sowie Singulett-Sauerstoff erzeugt, wobei dem Singulett-Sauerstoff eine dominierende Rolle in der photodynamischen Therapie (PDT) zugesprochen wird [JG94]. Jedoch häufen sich auch in zunehmendem Maße die Anzeichen dafür, daß auch Sauerstoffradikale eine nicht unwesentliche Rolle in der PDT zu spielen scheinen [SZ91, A01a]. Die Erzeugung des Singulett-Sauerstoffs wie auch der Sauerstoffradikale führen zu zahllosen Oxidations- und Reduktionsvorgängen innerhalb des Tumors, und zwar sowohl innerhalb von Tumorzellen selbst, als auch außerhalb der Tumorzellen wie etwa in Blutgefäßen oder bei den interzellulären Bestandteilen [P01a]. Wird eine Tumorzelle durch Sauerstoffradikale sowie Singulett-Sauerstoff geschädigt, so können diese als primäre Effekte neben den direkt zum Zelltod führenden Mechanismen der Nekrose sowie der Apoptose noch weitere Folgen nach sich ziehen, wie etwa die Schädigung der Zellmembranen durch Lipidperoxidation und die Freisetzung von Entzündungsfaktoren durch die Aktivierung von sogenannten Transkriptionsfaktoren. Abbildung 1.5 auf Seite 13 gibt nochmals eine kurze, schematische Zusammenfassung des Ablaufs der PDT.

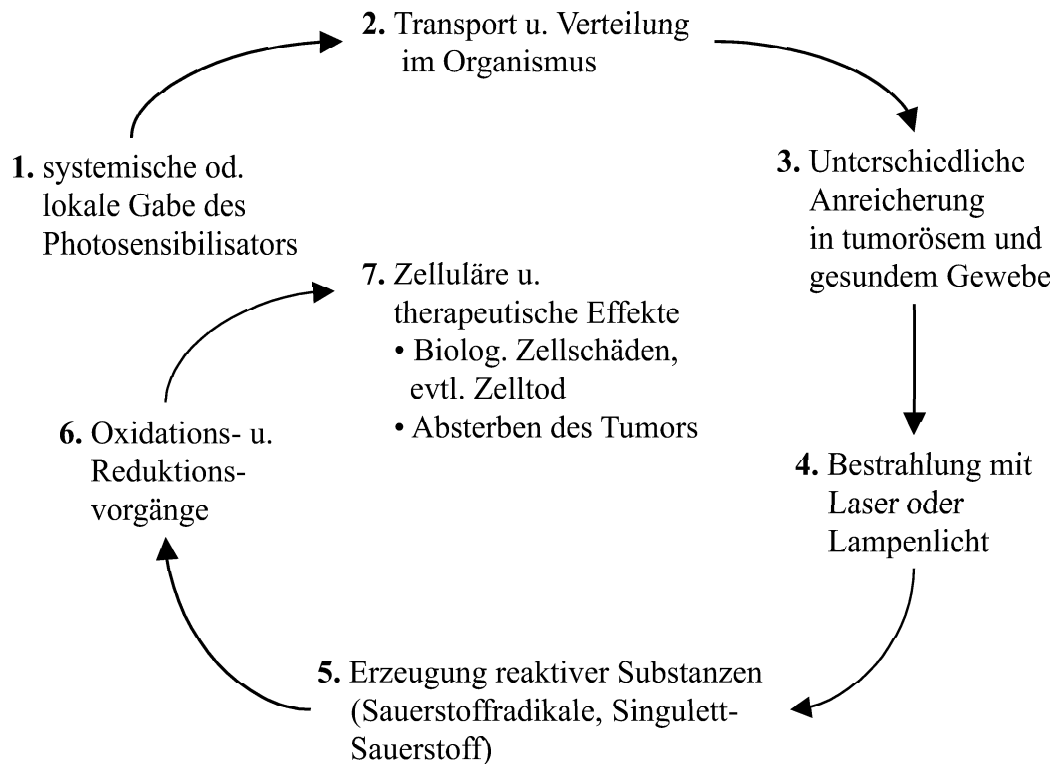


Abbildung 1.5: Schematischer Ablauf der Photodynamischen Therapie [SL94]

1.3 Anforderungen an ein optimales Photochemotherapeutikum

Wie bereits aus dem vorigen Paragraphen herauszulesen war, muß ein Photochemotherapeutikum bestimmte Voraussetzungen erfüllen. Die Kriterien für einen in der medizinischen Therapie anwendbaren Photosensibilisator wurden erstmals im Jahre 1973 durch T. J. Dougherty formuliert [D73]:

- i. Keine Toxizität bei therapeutischen Dosierungen
- ii. Selektive Aufnahme und Akkumulation in erkranktem Gewebe
- iii. Aktivierung durch Licht oberhalb von 600 nm
- iv. Photochemische Aktivität

Während die ersten beiden Kriterien wie auch das letzte selbstverständlich erscheinen, ist zum dritten Kriterium anzumerken, daß dieses lediglich für die photodynamische Therapie gültig ist, da z. B. bei der PUVA-Therapie der Wellenlängenbereich des UVA (315 - 400 nm) eingesetzt wird. Generell gilt jedoch, daß für die Eindringtiefe

von Licht in Gewebe die verwendete Wellenlänge entscheidend ist [IMM95], da neben der Reflexion und der Rückwärtsstreuung die Absorptionen von Wasser, Hämoglobin [WJL85] sowie Melanin [M93] entscheidend sind. Somit ergibt sich ein sogenanntes optisches Fenster, innerhalb dessen die Eindringtiefe des Lichts in Gewebe mit steigender Wellenlänge größer wird, durch das jedoch die Photochemotherapie grundsätzlich auf erkrankte Gewebe nahe der Oberfläche des betroffenen Organs beschränkt bleibt. Ein idealer Photosensibilisator besitzt möglichst intensive Absorptionsbanden innerhalb des optischen Fensters. Abbildung 1.6 zeigt noch das durch die Absorptionen von Melanin, Hämoglobin und Wasser gebildete optische Fenster (gelb hinterlegt). Zur Absorptionskurve von Wasser ist noch zu bemerken, daß verschiedene in der Literatur zu findenden Messungen um knapp eine Größenordnung differieren.

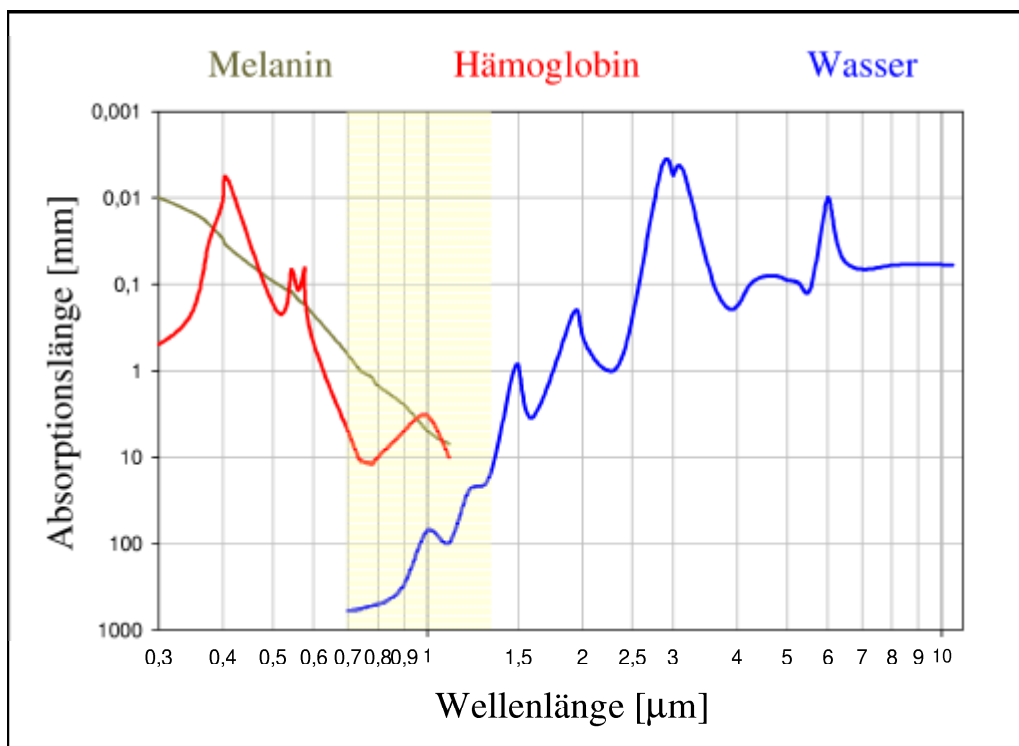


Abbildung 1.6: Optisches Fenster bei der Photodynamischen Therapie

Neben den oben genannten Anforderungen existieren noch eine Reihe weiterer an ein ideales Photochemotherapeutikum, wie z.B. ein möglichst hoher Wirkungsgrad. Desweiteren muß neben der Selektivität für erkranktes Gewebe eine gute Gewebepenetration gefordert werden [M90], um eine ausreichend hohe Photosensibilisator-Konzentration im gesamten zu behandelnden Areal zu gewährleisten, wobei die selektive Anreicherung in besonders sensiblen Zellbereichen [MMK96, HLL97] besonders wünschenswert wäre. Eine gute biologische Abbaubarkeit bzw. Ausscheidbarkeit des

Photosensibilisators sowie von dessen Photoprodukten wäre wünschenswert und ist z. B. gerade im Falle des Photofrins® nicht gegeben, woraus die langanhaltende Photosensibilisierung folgt [DGH98].

1.4 Primäre Prozesse bei der Photosensibilisierung

Der erste Schritt bei allen photosensibilisierenden Reaktionen besteht in der Absorption von Licht durch einen Photosensibilisator. Dadurch gelangt dieser in einen angeregten Zustand, bei dem es sich in der Regel um den S_1 -Zustand handelt und der aufgrund des Franck-Condon-Prinzips zusätzlich schwingungsangeregt ist. Dieser angeregte Singulett-Zustand ist jedoch durch die sehr effektiven Relaxationsmechanismen der internen Konversion (Internal Conversion, IC) sowie der Abgabe von Fluoreszenzlicht sehr kurzlebig. Typische Lebensdauern liegen im Piko- und Nanosekundenbereich [BLT94] und deshalb ist die Wahrscheinlichkeit, in diesem Zustand mit anderen Molekülen zu interagieren, sehr gering [A01a]. Durch einen Wechsel in der Spin-Multiplizität, der sog. Interkombination (Intersystem Crossing, ISC), welche vor allem durch die Spin-Bahn-Kopplung ermöglicht wird [HW98], ist zusätzlich die Relaxation in einen Triplett-Zustand möglich (siehe Abbildung 1.7).

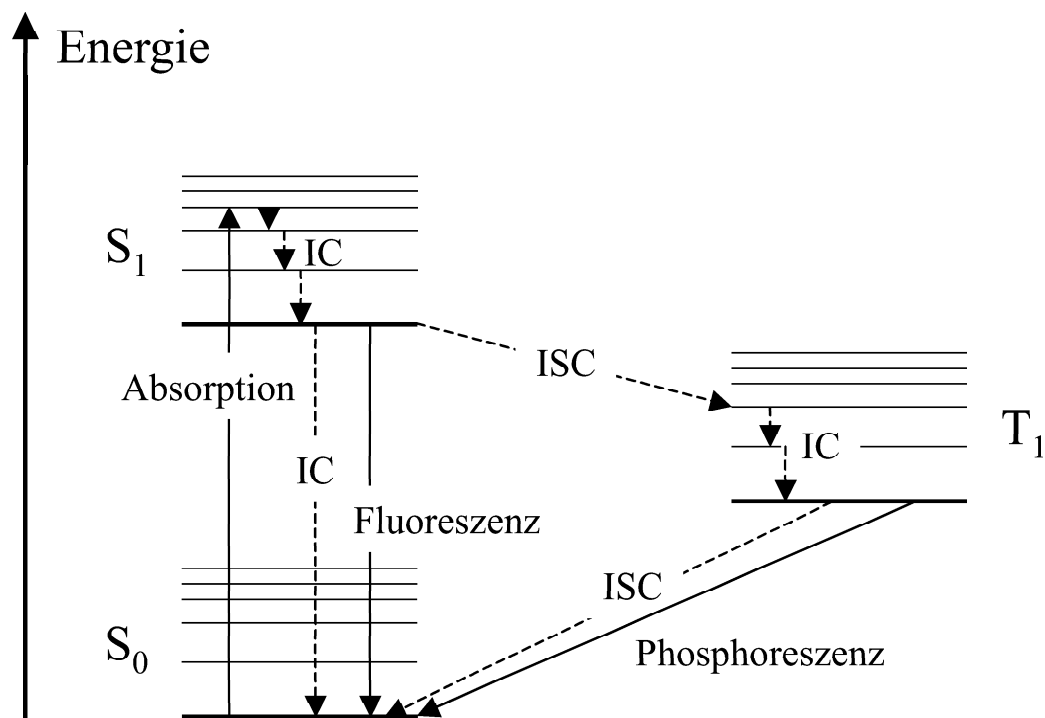
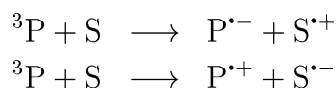


Abbildung 1.7: Jablonski-Diagramm für die Anregung und die möglichen Relaxationswege eines Photosensibilisators [A01a]

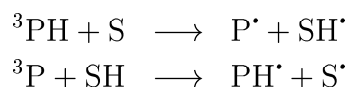
Dabei handelt es sich im allgemeinen um den T_1 -Zustand, der zunächst, ebenso wie der angeregte S_1 -Zustand, wegen des Franck-Condon-Prinzips eine Schwingungsanregung besitzt, die aber wiederum durch den strahlungslosen Prozeß der internen Konversion sehr schnell abgegeben werden kann (die Lebensdauern von angeregten Schwingungsniveaus liegen etwa bei 10^{-11} bis 10^{-14} s [BLT94]). Der T_1 -Zustand besitzt nun die beiden Relaxationsmöglichkeiten der Interkombination sowie der Abgabe von Phosphoreszenzlicht.

Eine graphische Zusammenstellung all dieser Prozesse, das Jablonski-Diagramm, zeigt Abbildung 1.7. Dargestellt sind der Singulett-Grundzustand S_0 , der erste angeregte Singulett-Zustand S_1 sowie der erste angeregte Triplett-Zustand T_1 . Jeder dieser elektronischen Zustände besitzt zusätzliche Schwingungsniveaus, welche durch dünne Linien angedeutet sind. Die strahlenden Übergänge Absorption, Fluoreszenz und Phosphoreszenz werden durch durchgehende Pfeile repräsentiert, alle nichtstrahlenden Übergänge wie die Interne Konversion (IC) und die Interkombination (ISC) durch gestrichelte Pfeile. Da jedoch die Rate für die Interkombination $S_1 \rightarrow T_1$ im allgemeinen etwa 10^4 bis 10^8 mal höher als die Rate für die Interkombination $T_1 \rightarrow S_0$ [SG68] und darüberhinaus eine Rückinterkombination $T_1 \rightarrow S_1$ wegen der Energiedifferenz zwischen T_1 und S_1 unwahrscheinlich ist, haben T_1 -Zustände eine wesentlich längere Lebensdauer als S_1 -Zustände. Je größer aber die Lebensdauer des T_1 -Zustandes des Photosensibilisators ist, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, durch Energieabgabe photochemische Reaktionen ablaufen zu lassen [O97].

Diese photochemischen Reaktionen lassen sich in zwei Gruppen einteilen [F91]. Bei der sog. photodynamischen Reaktion vom Typ I handelt es sich nach [A01a, G94a] um eine Reaktion zwischen einem angeregten Photosensibilisator, gewöhnlich im T_1 -Zustand, 3P , und einem Substratmolekül S , bei welcher ein Elektron gemäß:

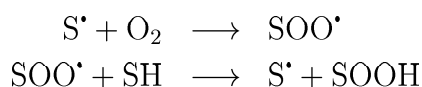


oder ein Wasserstoffatom gemäß:

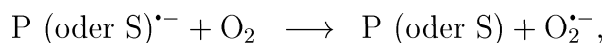


übertragen wird. Hier ist anzumerken, daß der Elektronentransfer prinzipiell in beide Richtungen stattfinden kann, jedoch die meisten biologischen Substrate oxidiert werden [A01a].

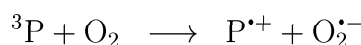
Die Radikale, welche aus den obigen primären Typ I-Prozessen entstehen, können anschließend verschiedene Reaktionen eingehen. Bei Anwesenheit von Sauerstoff ist neben der Generierung von Peroxidradikalen und Hydroperoxiden über eine Autooxidationskette [A01a]:



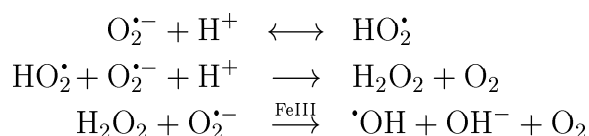
die Generierung des Superoxidanions wohl die Wichtigste. Diese wird zum einen ermöglicht durch eine Radikal-Reaktion,



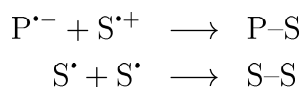
zum anderen durch direkten Elektronentransfer vom angeregten Photosensibilisator auf Sauerstoff:



Das Superoxidanion ist in der Lage, mit verschiedenen Substraten zu reagieren und dabei auch noch andere reaktive Sauerstoffspezies wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oder das Hydroxylradikal ($\cdot OH$) zu erzeugen [A01a]:

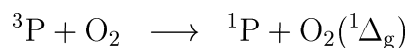


Bei Sauerstoffverarmung sind die primären Typ I-Radikale in der Lage, untereinander zu reagieren und kovalente Addukte von Photosensibilisator und Substrat zu bilden:



Diese Reaktionen sind im allgemeinen dann favorisiert, wenn vor der Absorption von Licht eine nicht-kovalente Komplexbildung stattfindet [K81].

Im Gegensatz zu dieser Reihe von Reaktionen, welche bei der photodynamischen Reaktion vom Typ I ablaufen und zur Bildung einiger Radikale führen können, ist die photodynamische Reaktion vom Typ II relativ einfach. Bei ihr ist die Anwesenheit von Sauerstoff zwingend erforderlich und es findet lediglich ein direkter Energieübertrag vom angeregten Photosensibilisatormolekül P auf Sauerstoff statt. Dies führt zum einen zur Relaxation des Sensibilisators aus dem T_1 -Zustand in den S_0 -Zustand, zum anderen aber auch zur elektronischen Anregung von Sauerstoff in den in der Regel niedrigsten Singulett($^1\Delta_g$)-Zustand [F91, A01a, G94a]:



Dieser angeregte Sauerstoff wird als Singulett-Sauerstoff $O_2(^1\Delta_g)$ oder kurz 1O_2 bezeichnet. In Kapitel 2 der vorliegenden Arbeit wird die Erzeugung durch einen Photosensibilisator sowie die Relaxation von Singulett-Sauerstoff genauer betrachtet.

An dieser Stelle sei noch bemerkt, daß nach Anregung eines Photosensibilisators grundsätzlich beide Reaktionstypen ablaufen können [A01a]. Die relativen Beiträge beider

Reaktionstypen und damit die relativen Beiträge der einzelnen reaktiven Zwischenprodukte sind bestimmt durch die äußeren Bedingungen [A01a] (z. B. Sauerstoffgehalt) wie auch durch spezifische Eigenschaften des Photosensibilisators wie der energetischen Lage des T_1 -Niveaus (z. B. ist die energetische Lage des T_1 -Niveaus des sehr effektiven Singulett-Sauerstoff-Generators Protoporphyrin IX sehr nahe beim $^1\Delta_g$ -Niveau des Sauerstoffs, wohingegen bei 8-Methoxypsoralen, dessen Effizienz bezogen auf die Singulett-Sauerstoff-Generierung sehr schlecht ist, das T_1 -Niveau energetisch etwa dreimal so hoch liegt, s. u.) oder des Oxidationspotentials des Photosensibilisators [WA97, WA99, AW00, DLJ99, SS01]. Einen Überblick über die wichtigsten primären Prozesse bei der Photosensibilisierung gibt Abbildung 1.8 [A01a, F91, G94a].

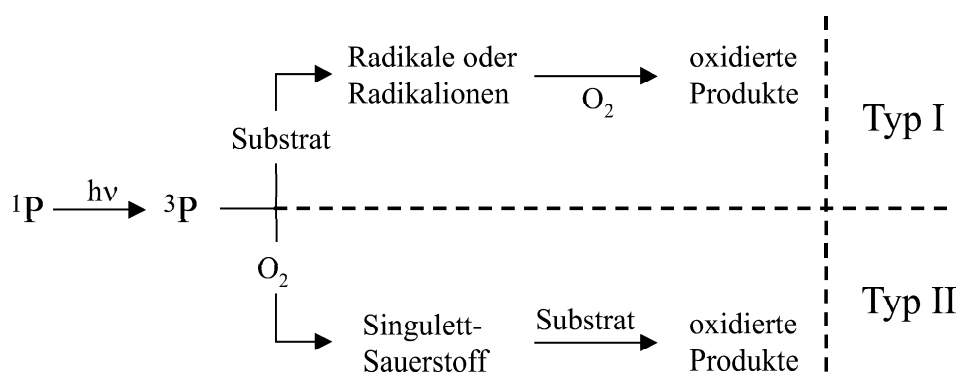


Abbildung 1.8: Übersicht über die wichtigsten Reaktionspfade bei der Photosensibilisierung [A01a, F91, G94a]

Abschließend sei noch bemerkt daß je nach Anwendungsgebiet das Setzen von lethalen oxidativen Zellschäden, z. B. durch Singulett-Sauerstoff bei der Tumorbehandlung [WGD76], oder aber eine mehr oder weniger subtile, immunmodulatorische Modifikation von erkrankten Zellen, z. B. bei der Behandlung von Psoriasis [HCN01], ein Hauptanliegen der Photochemotherapie darstellt [MO01].

Aus dem Vorangegangenen ist nun ersichtlich, daß dem Singulett-Sauerstoff bei der Photodynamischen Therapie eine zentrale Rolle zukommt, und das Beispiel des 8-Methoxypsoralens zeigt, daß dieser auch bei Photochemotherapien, die auf einem anderen Wirkmechanismus basieren, durchaus eine Rolle spielen kann, etwa durch die Induzierung von Nebenwirkungen. Aus diesem Grunde sei im folgenden Kapitel der Singulett-Sauerstoff sowie dessen Generierung und Relaxation näher betrachtet.

Kapitel 2

Singulett-Sauerstoff

Sauerstoff ist im Grundzustand $^3\Sigma_g^-$ ein Biradikal, d. h. daß das O_2 -Molekül zwei ungepaarte Elektronen besitzt. Deshalb ist der Grundzustand ein Triplett-Zustand. Desweiteren ist Sauerstoff ein sehr potentes Agens zur Deaktivierung elektronisch angeregter Moleküle [AW00]. Die aus diesem Deaktivierungsprozeß entstehenden angeregten Sauerstoffzustände $^1\Delta_g$ sowie $^1\Sigma_g^+$ [SB93] sind Singulett-Zustände (siehe Abbildung 2.1). Jedoch wird, wie bereits in Kapitel 1.4 erwähnt, lediglich der Sauerstoff im niedrigsten Anregungszustand $^1\Delta_g$ als Singulett-Sauerstoff bezeichnet, da der nächsthöhere angeregte Zustand $^1\Sigma_g^+$ in kondensierter Materie im allgemeinen sehr schnell durch Interne Konversion in den $^1\Delta_g$ -Zustand relaxiert [SB93, DLJ99].

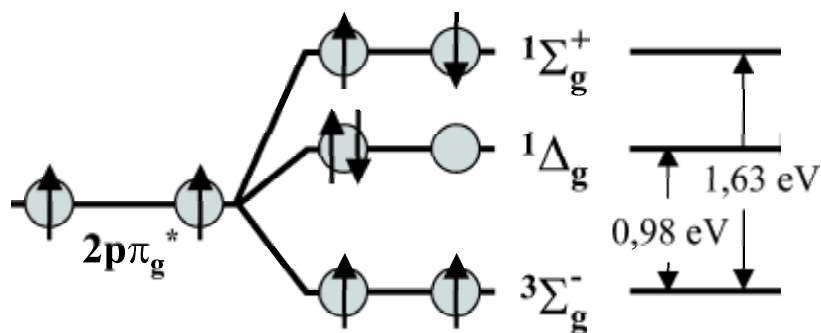
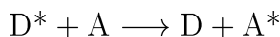


Abbildung 2.1: Mögliche Konfigurationen der beiden Elektronen im äußersten $2p\pi_g^*$ -Orbital des Sauerstoffmoleküls: Grundzustand und erste angeregte Zustände mit Energiedifferenz [HW98]

Neben der direkten Erzeugung von Singulett-Sauerstoff durch die Absorption von Licht geeigneter Wellenlänge [ET76] sowie der indirekten Methoden durch Beschuß eines Sauerstoff enthaltenden Solventen mit hochenergetischer Elektronenstrahlung, durch Mikrowellenentladungen in Sauerstoffgas [WHR95] oder aber durch enzymatische Reaktionen [ES01], besteht die für die Photosensibilisierung wohl wichtigste Erzeugungsmodalität aus dem Transfer von elektronischer Energie von einem Photosensibilisator

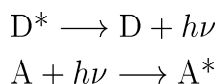
im angeregten Triplett-Zustand auf Sauerstoff im Grundzustand. Ebenso besitzt der intermolekulare Transfer von elektronischer Energie für die Relaxation von Singulett-Sauerstoff eine wesentliche Bedeutung. Deshalb seien im folgenden nun die wichtigsten Arten des Transfers von elektronischer Energie zwischen zwei Molekülen näher betrachtet. Dabei relaxiert ein angeregtes Donator-Molekül D^* in den Grundzustand, während seine Anregungsenergie auf ein Akzeptor-Molekül A gemäß



übertragen wird.

2.1 Strahlender intermolekularer Energietransfer

Beim strahlenden Transfer von elektronischer Energie handelt es sich um den einfachsten Mechanismus, bei dem ein angeregtes Donator-Molekül durch Emission eines Photons in den Grundzustand relaxiert, welches anschließend vom Akzeptor absorbiert wird [BLT94]:



Dieser strahlende Energietransfer ist weder für die Erzeugung noch für die Relaxation von Singulett-Sauerstoff von Bedeutung und ist hier lediglich aus Gründen der Vollständigkeit erwähnt.

2.2 Nichtstrahlende intermolekulare Energietransfers

Der nichtstrahlende Transfer von elektronischer Energie erfolgt entweder durch den kurzreichweitigen Prozeß des Austauschs desjenigen Elektrons welches die Anregung trägt gegen ein solches welches keine Anregung trägt (Dexter-Prozeß [D53]) oder durch die langreichweitige Dipol-Dipol-Wechselwirkung (Förster-Prozeß [F48, F59]) [BLT94].

2.2.1 Dexter-Prozeß

2.2.1.1 Allgemeines

Der Elektronenaustausch kommt durch einen Stoß von Donator und Akzeptor, und damit durch einen räumlichen Überlapp der Wellenfunktionen beider, zustande. Für

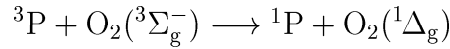
ein vibronisch nicht angeregtes System hängt die Rate des Energietransfers, k_{ET} , wie folgt vom Abstand beider Stoßpartner ab [D53]:

$$K_{\text{ET}} = K J e^{-\frac{2r}{L}}$$

Dabei ist K durch die spezifische Wechselwirkung der Orbitale gegeben und L eine weitere Konstante. J ist das auf den Absorptionskoeffizienten des Akzeptors normierte spektrale Überlappintegral, r ist der Abstand zwischen D^* und A.

2.2.1.2 Erzeugung von Singulett-Sauerstoff

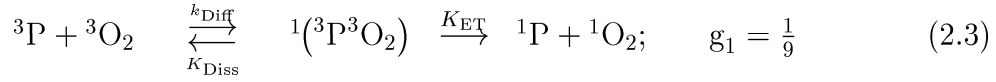
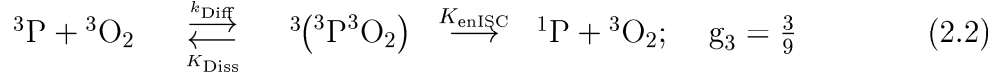
Beim nichtstrahlenden Energietransfer durch den Dexter-Prozeß ist die Spinerhaltung zu berücksichtigen: Wenn S_1 und S_2 die Spins von D^* und A vor dem Elektronenaustausch sind, dann muß der Gesamtspin des Systems nach dem Elektronenaustausch einen der Werte $|S_1 + S_2|$, $|S_1 + S_2 - 1|$, ..., $|S_1 - S_2|$ besitzen [BLT94]. Insbesondere gehorcht die Bildung von Singulett-Sauerstoff durch einen angeregten Photosensibilisator im Triplett-Zustand ^3P dieser Spinerhaltung:



Jedoch ist nicht jede Komplexbildung von ^3P und $\text{O}_2(^3\Sigma_g^-)$ mit der Bildung von Singulett-Sauerstoff $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ verbunden, genausowenig wie jede Relaxation von $^3\text{P} \longrightarrow ^1\text{P}$ durch die Komplexbildung zu einem Übergang $\text{O}_2(^3\Sigma_g^-) \longrightarrow \text{O}_2(^1\Delta_g)$ führt. Deshalb sei im folgenden die Bildung des molekularen Komplexes von ^3P und $\text{O}_2(^3\Sigma_g^-)$ genauer betrachtet [GKP73, T78].

^3P und $\text{O}_2(^3\Sigma_g^-)$ (im folgenden auch als $^3\text{O}_2$ bezeichnet) treffen zusammen durch Diffusion und bilden durch einen Überlapp ihrer Wellenfunktionen einen Komplex mit der Ratenkonstante k_{Diff} . Dieser Komplex $^i(^3\text{P}^3\text{O}_2)$ besitzt nun die Möglichkeiten, entweder mit der Rate K_{Diss} wieder in die ursprünglichen Reaktionspartner ^3P und $^3\text{O}_2$ zu dissoziieren (Gleichung (2.1)), oder mit der Rate K_{enISC} einen vibronisch hochangeregten Photosensibilisator im elektronischen Grundzustand ^1P mit einem Sauerstoff im Grundzustand $^3\text{O}_2$ zu liefern (Gleichung (2.2)), oder aber mit der Rate K_{ET} einen Photosensibilisator im Grundzustand ^1P mit einem Singulett-Sauerstoff $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ (im folgenden auch als $^1\text{O}_2$ bezeichnet) zu produzieren (Gleichung (2.3)). i bezeichnet hierbei die Spinmultiplizität des Komplexes, K_{ET} die Energietransferrate und K_{enISC} eine Rate, die die intrinsische Interkombinationsrate von ^3P vergrößert. Da sich die beiden ursprünglichen Reaktionspartner ^3P und $^1\text{O}_2$ im Triplett-Zustand befinden (jeweils $S = 1$), sind die möglichen Zustände des Komplexes ein Quintett ($S = 2$, $i = 5$), ein Triplett ($S = 1$, $i = 3$) oder ein Singulett ($S = 0$, $i = 1$). Daraus folgt, daß die Anzahl aller möglichen Spinzustände neun ist. Die folgenden Gleichungen geben eine kurze Zusammenfassung der möglichen Vorgänge. Dabei bezeichnet g_i den Spin-Statistikfaktor,

der gleich der Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines Spinzustandes ist.



Nimmt man nun für die Reaktionen (2.1) bis (2.3) die Spinerhaltung an, d.h. daß eine Interkombination zwischen den Komplexen $^{1,3,5}(^3\text{P}^3\text{O}_2)$ wesentlich unwahrscheinlicher ist als jeder spinerhaltende Prozeß, so kann eine Relaxation von ^3P nur über einen Komplex im Singulett- oder Triplett-Zustand stattfinden und die Generierung von Singulett-Sauerstoff nur über einen Singulett-Komplex [GKP73]. Somit kann nur bei $\frac{4}{9}$ aller Stöße zwischen ^3P und $^3\text{O}_2$ der Photosensibilisator in den elektronischen Grundzustand relaxieren und lediglich bei $\frac{1}{9}$ aller vorkommenden Stöße wird Singulett-Sauerstoff generiert.

Die experimentell beobachtbaren Ratenkonstanten für die gesamte sauerstoffinduzierte Relaxation des Photosensibilisators $^3\text{P} + ^3\text{O}_2 \longrightarrow ^1\text{P} + ^1,^3\text{O}_2$, k_{TO_2} , bzw. für den Energietransfer $^3\text{P} + ^3\text{O}_2 \longrightarrow ^1\text{P} + ^1\text{O}_2$, $k_{\text{T}\Delta}$, sind wie folgt gegeben [GKP73, T78]:

$$k_{\text{TO}_2} = \frac{1}{9}k_{\text{Diff}} \left(\frac{k_{\text{ET}} [\text{O}_2]}{k_{\text{ET}} [\text{O}_2] + K_{\text{Diss}}} \right) + \frac{3}{9}k_{\text{Diff}} \left(\frac{k_{\text{enISC}} [\text{O}_2]}{k_{\text{enISC}} [\text{O}_2] + K_{\text{Diss}}} \right) \quad (2.4)$$

$$k_{\text{T}\Delta} = \frac{1}{9}k_{\text{Diff}} \left(\frac{k_{\text{ET}} [\text{O}_2]}{k_{\text{ET}} [\text{O}_2] + K_{\text{Diss}}} \right) \quad (2.5)$$

Für die Diffusionsratenkonstante k_{Diff} existieren die Abschätzungen [T78]:

$$k_{\text{Diff}} [\text{s}^{-1}\text{M}^{-1}] = 2 \cdot 10^5 \frac{T}{\eta} \quad (2.6)$$

sowie [W62]:

$$k_{\text{Diff}} = \frac{4\pi N_{\text{A}}}{1000} (D_{\text{P}} + D_{\text{O}_2}) \cdot (r_{\text{P}} + r_{\text{O}_2}) \quad (2.7)$$

Hierbei ist T die Temperatur in K, η die Viskosität des Lösungsmittels in Poise, D_{P} und D_{O_2} sind die Diffusionskoeffizienten des Photosensibilisators und des Sauerstoffmoleküls sowie r_{P} und r_{O_2} die zugehörigen Molekülradien. Schließlich kann bei bekannter Diffusionsratenkonstante k_{Diff} die Dissoziationsrate K_{Diss} des Komplexes $^i(^3\text{P}^3\text{O}_2)$ über die Gleichung

$$\frac{k_{\text{Diff}}}{K_{\text{Diss}}} = \frac{4}{3}\pi N_{\text{A}} r^3 \quad (2.8)$$

berechnet werden [W62], wobei N_{A} die Avogadro-Konstante und $r = r_{\text{P}} + r_{\text{O}_2}$ der internukleare Abstand der beiden Moleküle ist.

2.2.2 Förster-Prozeß

2.2.2.1 Allgemeines

Für den Förster-Prozeß, d. h. den nichtstrahlenden Übertrag von elektronischer Energie über die Dipol-Dipol-Wechselwirkung, müssen Donator und Akzeptor so weit voneinander entfernt sein, so daß ihre Wellenfunktionen nur noch einen vernachlässigbaren Überlapp bilden können. Hierbei hängt die Rate des Energietransfers, k_{ET} , wie folgt vom Abstand beider Reaktionspartner ab [F48]:

$$k_{\text{ET}} = \frac{1}{\tau_{\text{D}}} \left(\frac{r_0}{r} \right)^6$$

τ_{D} ist hierbei die Lebensdauer des Donators, r ist der Abstand zwischen D^* und A und r_0 ist hierbei eine kritische Transferdistanz, bei welcher die Transferrate gleich der Rate der spontanen Relaxation ist [BLT94].

Als Auswahlregel für den Spin beim Förster-Prozeß gilt, daß sich der Spin weder beim Donator noch beim Akzeptor ändern darf, d. h. $\Delta S = 0$ [BLT94].

2.2.2.2 Relaxation von Singulett-Sauerstoff

Trotz der bei einem Übergang $^1\text{O}_2 \longrightarrow ^3\text{O}_2$ mittels des Förster-Prozesses nötigen Verletzung der für diesen geltenden Spin-Auswahlregel spielt dieser für die strahlungslose Relaxation von Singulett-Sauerstoff eine wesentliche Rolle [MK72]. Eine Lockerung der oben genannten Auswahlregel tritt in Lösungen durch intermolekulare Störungen (wie Stöße der Sauerstoffmoleküle untereinander oder mit Lösungsmittelmolekülen) auf, so daß sich die Singulett-Sauerstoff-Relaxationsrate in Lösungen um Größenordnungen erhöhen kann, verglichen mit dem isolierten Singulett-Sauerstoff-Molekül. Auf eine explizite Beschreibung der Grundlagen des Förster-Prozesses soll hier verzichtet werden. Eine schematische Skizze des Energieübertrags vom Sauerstoff- auf ein Lösungsmittelmolekül zeigt Abbildung 2.2 auf Seite 24. Hierbei relaxiert das Sauerstoffmolekül vom nullten Schwingungsniveau des $^1\Delta_{\text{g}}$ -Zustandes zum m -ten Schwingungsniveau des elektronischen Grundzustandes $^3\Sigma_{\text{g}}^-$ durch Energieübertrag auf ein Lösungsmittelmolekül, welches vom nullten Schwingungsniveau zum n -ten Schwingungsniveau des elektronischen Grundzustandes angeregt wird.

Es gilt, daß die Relaxationsrate k_{if} des Singulett-Sauerstoffs vom Gros der Eigenschaften des Lösungsmittels wie etwa Polarität, Viskosität, Polarisierbarkeit, Ionisierungspotential und auch Sauerstofflöslichkeit, unabhängig ist [MK72].

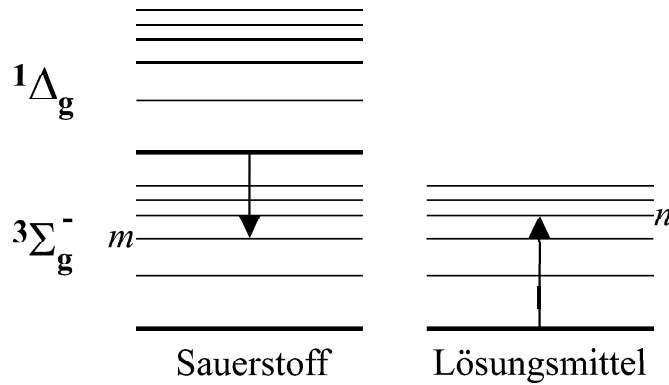


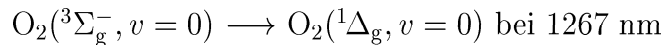
Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des Energieübertrags von einem Sauerstoff- auf ein Lösungsmittelmolekül

2.3 Spektroskopie

Betrachtet man die strahlende Relaxation des Singulett-Sauerstoffs, so gilt hier, ebenso wie für den Förster-Prozeß, die Auswahlregel, $\Delta S = 0$ [H50]. Insbesondere gilt dies für alle homonuklearen zweiatomigen Moleküle [H50]. Desweiteren gilt für deren strahlende Relaxation noch die Auswahlregel für den Drehimpuls $\Delta \Lambda = 0, \pm 1$ und der vorgeschriebene Paritätswechsel bei elektrischen Dipolübergängen. Somit stellt eine dennoch stattfindende Relaxation des Singulett-Sauerstoffs in seinen Grundzustand einen magnetischen Dipolübergang dar. Sie wäre zwar als elektrischer Quadrupolübergang ebenfalls erlaubt, jedoch ist der Beitrag elektrischer Quadrupolstrahlung zur Übergangswahrscheinlichkeit nur etwa 10^{-3} bis 10^{-4} des Beitrags der magnetischen Dipolstrahlung und somit vernachlässigbar [H50]. Aufgrund der bei einem Übergang $^1\text{O}_2 \rightarrow ^3\text{O}_2$ stattfindenden Verletzung der oben genannten Auswahlregeln stellt der $^1\Delta_g$ -Zustand einen bedeutenden metastabilen Zustand des O_2 -Moleküls dar. Insbesondere besitzt das isolierte Singulett-Sauerstoff-Molekül mit $\tau(\text{O}_2(^1\Delta_g) \rightarrow \text{O}_2(^3\Sigma_g^-)) = 4348 \text{ s}$ [KPB83, K85] eine extrem lange Lebensdauer bezüglich strahlender Relaxation. In Gasen, Lösungen und kondensierter Materie werden die Auswahlregeln aufgeweitet und es finden stoßinduzierte elektrische Dipolübergänge statt.

Da in der Literatur weder Angaben zu Emissionslinien noch zu Absorptionslinien von gelöstem Sauerstoff zu finden sind, zeigt Abbildung 2.3 auf Seite 25 einige Absorptionslinien von flüssigem Sauerstoff. Diese Daten für die Lage der Banden sind auch für gelösten Sauerstoff verwendbar, da sich nach [H50] die elektronischen Absorptionsbanden zweiatomiger Moleküle bei Verflüssigung aus dem Gaszustand bzw. beim Lösen in einer anderen Flüssigkeit nur wenig verschieben.

Gezeigt sind der rein elektronische Einzelmolekülübergang



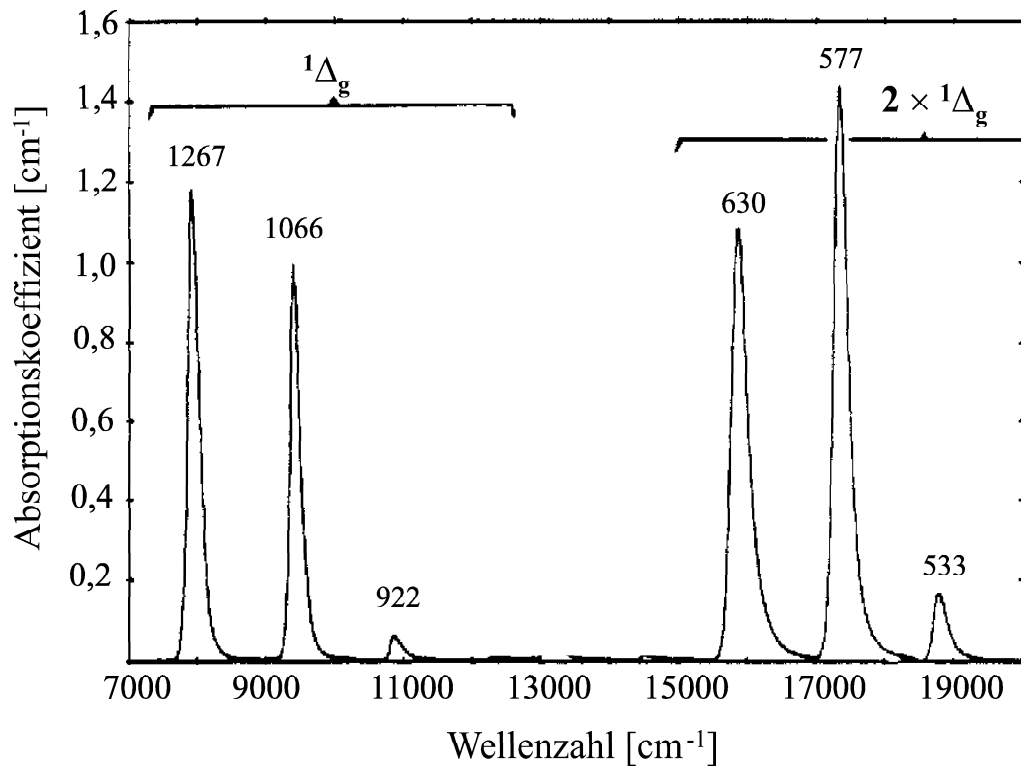
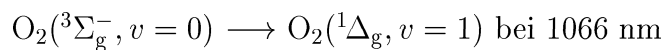
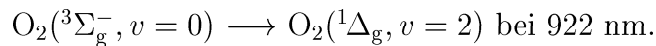


Abbildung 2.3: Ausgewählte Absorptionslinien von flüssigem Sauerstoff im sichtbaren und nahen infraroten Spektralbereich; Bezeichnung der Maxima mit der Wellenlänge in nm

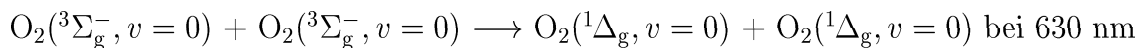
(die sog. IR-atmosphärische Bande) mit den zugehörigen schwingungsverschobenen Absorptionslinien



und



Desweiteren ist der Doppelmolekülübergang



mit den zugehörigen schwingungsverschobenen Linien bei 577 nm und 533 nm gezeigt.

Die schwingungsverschobenen Linien der Einzel- und Doppelmolekülübergänge sind jedoch nur im Absorptionsspektrum kurzwelliger als der rein elektronische Übergang, in der Emission sind die Energien eines rein elektronischen Übergangs ohne Beteiligung

eines Schwingungsquants höher als mit, so daß schwingungsverschobene Emissionslinien langwelliger sind. Da sich nach [H50, K72] die Kernabstände der beiden Zustände $^3\Sigma_g^-$ und $^1\Delta_g$ um weniger als ein Prozent unterscheiden, ist ein Einzelmolekülübergang ohne Beteiligung eines Schwingungsquants am wahrscheinlichsten. Dies ist auch aus Abbildung 2.3 auf Seite 25 zu ersehen.

Für die Lumineszenzspektroskopie von Singulett-Sauerstoff ist deshalb die Emission bei 1267 nm zu wählen. Jedoch ist die Lumineszenzquantenausbeute sehr klein, sie beträgt etwa $2 \cdot 10^{-5}$ in schwerem Wasser (D_2O) und circa $1 \cdot 10^{-6}$ in Wasser (H_2O) [LBG88]. Dies bedeutet zum einen sehr schwache Lumineszenzsignale, zum anderen, daß die strahlende Deaktivierung einen vernachlässigbaren Beitrag zur Relaxation einer gegebenen Konzentration $[^1O_2](t)$ an Singulett-Sauerstoffmolekülen liefert, so daß die Lumineszenzleistung $P_L^{1267}(t)$ bei 1267 nm für alle Zeiten proportional zur momentanen Konzentration angenommen werden kann:

$$P_L^{1267}(t) \propto [^1O_2](t) \quad (2.9)$$

2.4 Ratengleichungssystem für die Erzeugung und Relaxation von Singulett-Sauerstoff

Zur Beschreibung der Zeitabhängigkeit der Konzentrationen des Triplett- T_1 -Zustandes des Photosensibilisators sowie des $^1\Delta_g$ -Zustandes des Sauerstoffs wird ein – verglichen mit dem Standardmodell von J. G. Parker und W. D. Stanbro [PS84] – von Mitarbeitern aus der eigenen Arbeitsgruppe erweitertes Differentialgleichungssystem benutzt, dessen zugehöriges Energieniveauschema in Abbildung 2.4 auf Seite 28 gezeigt ist. Gezeigt sind die zum Photosensibilisator gehörenden Zustände S_0 , S_1 und T_1 , der $^3\Sigma_g^-$ - und $^1\Delta_g$ -Zustand des Sauerstoffs, die Grundzustände des Lösungsmittels sowie eines evtl. vorhandenen Quenchers (s. u.). Gezeigt sind weiter die Relaxationsraten k_i [s^{-1}] des T_1 -Zustandes des Photosensibilisators und des $^1\Delta_g$ -Zustandes des Sauerstoffs sowie die Übergangsratenkonstanten k_{ij} [$s^{-1}M^{-1}$]. Die Ratenkonstante, welche die Sauerstoff-induzierte Deaktivierung des T_1 -Zustandes beschreibt, $k_{T_1O_2}$, setzt sich zusammen aus der Energietransferratenkonstante $k_{T_1\Delta}$, die zur Anregung des $^1\Delta_g$ -Zustandes führt, und einer Ratenkonstante $k'_{T_1O_2}$, die alle anderen Deaktivierungsprozesse des T_1 -Zustandes durch Sauerstoff zusammenfasst, so daß

$$k_{T_1O_2} = k'_{T_1O_2} + k_{T_1\Delta}$$

gilt (siehe Gleichung (2.4)). Ähnliches gilt auch für die Ratenkonstante, die die Photosensibilisator-induzierte Deaktivierung des Singulett-Sauerstoffs beschreibt. Sie setzt sich zusammen aus einer Ratenkonstante $k_{\Delta T_1}$, bei deren zugehörigem Prozeß Singulett-Sauerstoff deaktiviert und dadurch Photosensibilisator- T_1 -Zustände generiert werden

sowie einer Ratenkonstante $k'_{\Delta S_0}$, die die anderen Deaktivierungsprozesse wie physikalisches und chemisches Quenchen zusammenfasst, so daß gilt:

$$k_{\Delta S_0} = k'_{\Delta S_0} + k_{\Delta T_1}$$

Als Quencher einer Substanz wird eine weitere Substanz bezeichnet, die die angeregten Zustände ersterer zu deaktivieren vermag. Demnach ist ein Singulett-Sauerstoff-Quencher eine Substanz, die den angeregten Singulett-Sauerstoff-Zustand deaktiviert [YB76]. Dabei spielt es zunächst keine Rolle, ob die Deaktivierung über eine chemische Reaktion mit dem Sauerstoffmolekül stattfindet (chemisches Quenchen) oder ob die Quenchersubstanz chemisch unverändert bleibt (physikalisches Quenchen). Eine Unterscheidung zwischen physikalischem und chemischem Quencher ist stets fließend, da verschiedene Substanzen unter Umständen sowohl zu chemischem als auch zu physikalischem Quenchen in der Lage sind. Darunter befindet sich z. B. Histidin, eine essentielle Aminosäure, die bei Quenchingprozessen in biologischen Systemen eine zentrale Rolle spielt. Meist jedoch überwiegt einer der beiden Abläufe stark gegenüber dem anderen und entsprechend wird dann die Charakterisierung der Quenchersubstanz gewählt [B76]. Im Rahmen dieser Arbeit soll die Bezeichnung Quencher stets einen überwiegend physikalischen Quencher bezeichnen. Überwiegend chemische Quencher, d. h. solche Substanzen, die den angeregten Sauerstoffzustand hauptsächlich durch Reaktion zerstören, werden im folgenden als Akzeptor bezeichnet, da sie überwiegend an das angeregte Sauerstoffmolekül binden. Es sei jedoch ausdrücklich darauf hingewiesen, daß durch obige Definition einem Akzeptor nicht die Fähigkeit zu physikalischem und einem Quencher nicht die zu chemischem Quenchen abgesprochen wird. Man beachte, daß nach Definition die Relaxation der $^1\Delta_g$ -Zustände durch Wechselwirkung mit Lösungsmittelmolekülen ebenfalls einen Quenchingprozeß darstellt. Es sei noch erwähnt, daß nach [B76] eine diffusionsbedingte obere Grenze für das rein physikalische Quenchen von $k_{\Delta Q}^{\max} = 3 \cdot 10^{10} \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1} = 3 \cdot 10^{10} \text{ s}^{-1} \frac{1}{\text{mol}}$ existiert.

Gemäß des in Abbildung 2.4 auf Seite 28 gezeigten Energieniveauschemas lassen sich folgende gekoppelte Differentialgleichungen für den zeitlichen Verlauf der Konzentration an Triplett- T_1 -Zuständen des Photosensibilisators $[T_1]$ und der Singulett-Sauerstoff-Konzentration $[^1O_2]$ aufstellen. Bei der Lösung der Differentialgleichungen wird von einer Startkonzentration an T_1 - und $^1\Delta_g$ -Zuständen ausgegangen, wobei letztere Null gesetzt wird.

$$\frac{d[T_1]}{dt} = - \{ k_{T_1} + (k'_{T_1 O_2} + k_{T_1 \Delta}) [^3O_2] + k_{T_1 S_0} [S_0] + k_{T_1 Q} [Q] \} [T_1] + k_{\Delta T_1} [S_0] [^1O_2] \quad (2.10)$$

$$\frac{d[^1O_2]}{dt} = - \{ k_{\Delta} + (k'_{\Delta S_0} + k_{\Delta T_1}) [S_0] + k_{\Delta Q} [Q] \} [^1O_2] + k_{T_1 \Delta} [^3O_2] [T_1] \quad (2.11)$$

Hier bezeichnen $[^3O_2]$ und $[S_0]$ die Konzentrationen an Sauerstoff und Photosensibilisator im Grundzustand. Als Abkürzung führt man noch die Gesamtrelexationsraten

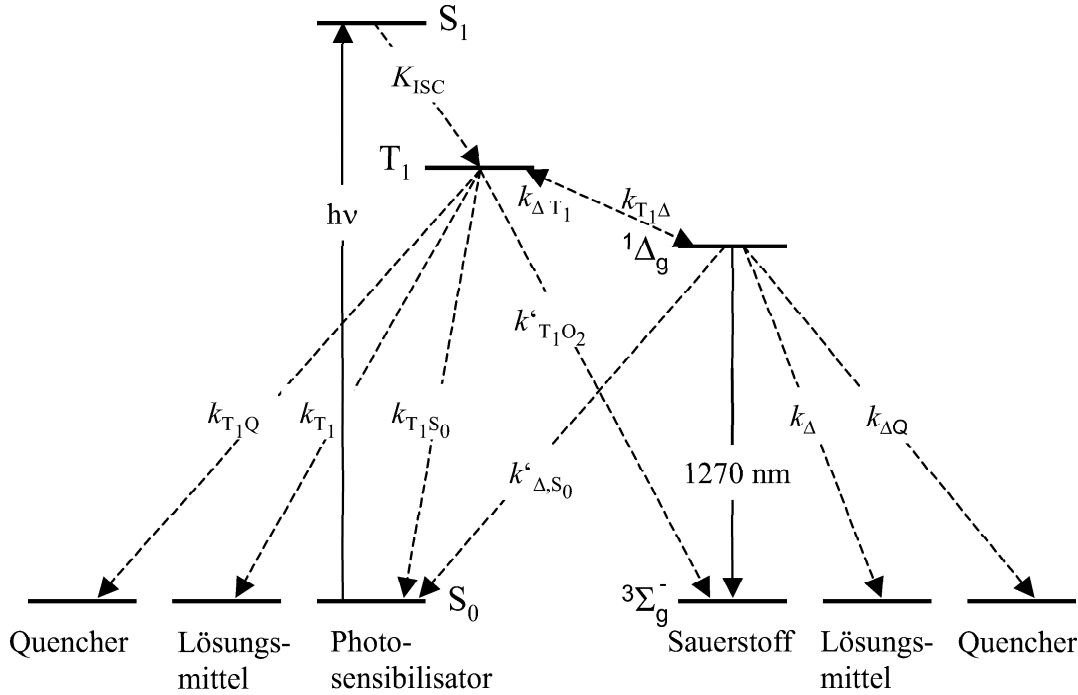


Abbildung 2.4: Vereinfachtes Energieniveauschema als Basis des zugrundegelegten Modells

K_{T_1} und K_{Δ} des T_1 -Zustands des Farbstoffs und des $^1\Delta_g$ -Sauerstoff ein:

$$K_{T_1} := k_{T_1} + k_{T_1O_2}[^3O_2] + k_{T_1S_0}[S_0] + k_{T_1Q}[Q] \quad (2.12)$$

$$K_{\Delta} := k_{\Delta} + k_{\Delta S_0}[S_0] + k_{\Delta Q}[Q] \quad (2.13)$$

Ist die Sättigungsintensität $I_{\text{sat}} = \frac{h\nu_L}{\sigma\tau_F}$ (hierbei ist h das Plancksche Wirkungsquantum, $\nu_L = \frac{c_0}{\lambda_L}$ die Frequenz des Lasers, c_0 die Vakuumlichtgeschwindigkeit, λ_L die Laserwellenlänge, σ der Absorptionswirkungsquerschnitt bei λ_L und τ_F die Fluoreszenzlebensdauer des Photosensibilisators) [H67] für den Übergang $S_0 \rightarrow S_1$ groß gegen die Laserintensität, so kann die Konzentration an Photosensibilisator im Grundzustand, $[S_0]$, für alle Zeiten näherungsweise gleich der Photosensibilisator-Konzentration in Lösung $[P]$ gesetzt werden. Ist weiterhin die Konzentration an Photosensibilisator im Triplett- T_1 -Zustand $[T_1]$ klein gegen die Sauerstoffkonzentration in Lösung $[O_2]$, so kann die Konzentration an Grundzustandssauerstoff $[^3O_2]$ näherungsweise gleich der Sauerstoffkonzentration $[O_2]$ gesetzt werden. Von der Gültigkeit dieser Näherungen, die bei der Durchführung der Experimente durch entsprechende Wahl der Laserintensität zu erreichen ist, wird im folgenden ausgegangen. Man erhält:

$$K_{T_1} = k_{T_1} + k_{T_1O_2}[O_2] + k_{T_1S_0}[P] + k_{T_1Q}[Q] \quad (2.14)$$

$$K_{\Delta} = k_{\Delta} + k_{\Delta S_0}[P] + k_{\Delta Q}[Q] \quad (2.15)$$

2.4.1 Allgemeiner Fall: $k_{\Delta T_1} > 0$

$k_{\Delta T_1} > 0$ bedeutet, daß ein Rücktransfer von Energie vom Singulett-Sauerstoff auf den Photosensibilisator unter Erzeugung von Photosensibilisator-Triplett- T_1 -Zuständen stattfindet. Durch Differenzieren der Gleichung (2.12) nach der Zeit t und anschließendem Einsetzen von Gleichung (2.11) erhält man eine Gleichung, die formal Äquivalenz mit der Schwingungsdifferentialgleichung des gedämpften harmonischen Oszillators aufweist:

$$\frac{d^2 [^1O_2]}{dt^2} + (K_{\Delta} + K_{T_1}) \frac{d [^1O_2]}{dt} + (K_{\Delta} K_{T_1} - k_{T_1 \Delta} [O_2] k_{\Delta T_1} [P]) [^1O_2] = 0 \quad (2.16)$$

Mit dem Ansatz $[^1O_2] \propto e^{-\beta t}$ erhält man für die Raten $\beta_{1,2}$ den Ausdruck:

$$\beta_{1,2} = \frac{1}{2} \left[K_{T_1} + K_{\Delta} \pm \sqrt{(K_{T_1} - K_{\Delta})^2 + 4k_{T_1 \Delta} [O_2] k_{\Delta T_1} [P]} \right]. \quad (2.17)$$

β_1 und β_2 entsprechen der Anstiegs- und Abklingrate der Konzentration des $^1\Delta_g$ -Zustands. Als Lösungen der Differentialgleichungen (2.11) und (2.12) erhält man unter der Voraussetzung $\beta_1 \neq \beta_2$

$$[T_1](t) = \frac{[T_1]_0}{\beta_1 - \beta_2} [(\beta_1 - K_{\Delta}) e^{-\beta_1 t} + (K_{\Delta} - \beta_2) e^{-\beta_2 t}] \quad (2.18)$$

für die Konzentration an T_1 -Zuständen des Photosensibilisators und

$$[^1O_2](t) = \frac{[T_1]_0 k_{T \Delta} [O_2]}{\beta_1 - \beta_2} (e^{-\beta_2 t} - e^{-\beta_1 t}) \quad (2.19)$$

für die Konzentration des $^1\Delta_g$ -Zustands von Sauerstoff. $[T_1]_0$ bezeichnet dabei die Startkonzentration an Triplett- T_1 -Zuständen des Photosensibilisators zur Zeit $t = 0$ (entspricht dem Ende der optischen Anregung), die von der Energie des Anregungspulses, dem Absorptionsquerschnitt des Photosensibilisators sowie von dessen Triplett-Quantenausbeute abhängt. Das experimentell zu beobachtende Lumineszenzsignal ist proportional zu $[^1O_2](t)$. Ist also $\beta_1 > \beta_2$, so ist der Anstieg der Singulett-Sauerstoff-Konzentration $[^1O_2]$ für $t \ll \frac{1}{\beta_1}$ durch β_1 bestimmt, für $t \gg \frac{1}{\beta_2}$ klingt $[^1O_2]$ exponentiell mit der Rate β_2 ab und *vice versa* bei $\beta_1 < \beta_2$.

2.4.2 Spezieller Fall: $k_{\Delta T_1} = 0$

Die Erzeugung von Photosensibilisator-Triplett- T_1 -Niveaus durch den Rücktransfer von Energie vom Singulett-Sauerstoff auf den Photosensibilisator im Grundzustand ist abhängig vom Energieunterschied zwischen dem Triplett- T_1 -Niveau und dem $^1\Delta_g$ -Niveau des Sauerstoffs. Es ist jedoch anzunehmen, daß ab einem gewissen Abstand

kein nennenswerter Rücktransfer mehr stattfindet, also $k_{\Delta T_1} \approx 0$ ist. Dadurch ergibt sich:

$$\beta_1 \equiv K_{T_1} = k_{T_1} + k_{T_1 O_2}[O_2] + k_{T_1 S_0}[P] + k_{T_1 Q}[Q] \quad (2.20)$$

$$\beta_2 \equiv K_{\Delta} = k_{\Delta} + k_{\Delta S_0}[P] + k_{\Delta Q}[Q] \quad (2.21)$$

sowie als Lösungen der Gleichungen (2.11) und (2.12):

$$[T_1](t) = [T_1]_0 e^{-K_{T_1} t} \quad (2.22)$$

$$[^1O_2](t) = [T_1]_0 \frac{k_{T_1 \Delta}[O_2]}{K_{T_1} - K_{\Delta}} (e^{-K_{\Delta} t} - e^{-K_{T_1} t}) \quad \text{für } K_{\Delta} \neq K_{T_1} \quad (2.23)$$

bzw.

$$[^1O_2](t) = [T_1]_0 k_{T_1 \Delta}[O_2] t e^{-K_{\Delta} t} \quad \text{für } K_{\Delta} = K_{T_1} \quad (2.24)$$

Betrachtet sei nun der Fall $K_{\Delta} \neq K_{T_1}$. Gilt $K_{T_1} > K_{\Delta}$, so ist der Anstieg der Singulett-Sauerstoff-Konzentration $[^1O_2]$ für $t \ll \frac{1}{K_{T_1}}$ durch K_{T_1} bestimmt, für $t \gg \frac{1}{K_{\Delta}}$ klingt $[^1O_2]$ exponentiell mit der Rate K_{Δ} ab und *vice versa* bei $K_{T_1} < K_{\Delta}$. Im Falle $K_{\Delta} = K_{T_1}$ steigt für $t \ll \frac{1}{K_{\Delta}}$ die Singulett-Sauerstoff-Konzentration $[^1O_2]$ linear mit der Zeit an und klingt exponentiell mit der Rate K_{Δ} ab. Durch Differenzieren der Gleichung (2.23) nach der Zeit erkennt man, daß das Maximum der Singulett-Sauerstoff-Konzentration mit steigender Relaxationsrate K_{Δ} abnimmt.

2.4.3 Beispiele

Zur Verdeutlichung der oben beschriebenen Fälle $k_{\Delta T_1} > 0$ und $k_{\Delta T_1} = 0$ zeigt Abbildung 2.5 a) auf Seite 31 die Anstiegs- und Abklingraten β_1 und β_2 für $k_{\Delta T_1} > 0$ (blau) sowie die Anstiegs- und Abklingraten K_{T_1} und K_{Δ} für $k_{\Delta T_1} = 0$ (schwarz) der Singulett-Sauerstoff-Konzentration $[^1O_2]$ in Abhängigkeit der Sauerstoffkonzentration $[O_2]$. Zu erkennen ist, daß es für $k_{\Delta T_1} = 0$ einen Schnittpunkt zwischen Anstiegs- und Abklingraten geben kann, wohingegen sich die Anstiegs- und Abklingraten für $k_{\Delta T_1} > 0$ nicht schneiden (*avoided crossing*).

Desweiteren wird in Abbildung 2.5 b) auf Seite 31 der zeitliche Verlauf der Singulett-Sauerstoff-Konzentration bei einer Sauerstoff-Konzentration von $10 \mu\text{M}$ für $k_{\Delta T_1} > 0$ (blau) und für $k_{\Delta T_1} = 0$ (schwarz) gezeigt. Für die blauen Kurven ($k_{\Delta T_1} > 0$) dieser Abbildungen wurden sämtliche Relaxationsraten und -ratenkonstanten von Photofrin[®] verwendet, für welches $k_{\Delta T_1} > 0$ gilt [KMS01]. Für die schwarzen Kurven ($k_{\Delta T_1} = 0$) wurde $k_{\Delta T_1} = 0$ gesetzt und die übrigen Raten und Ratenkonstanten belassen. Wie man erkennt, klingt die Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz bei $k_{\Delta T_1} > 0$ langsamer ab als bei $k_{\Delta T_1} = 0$.

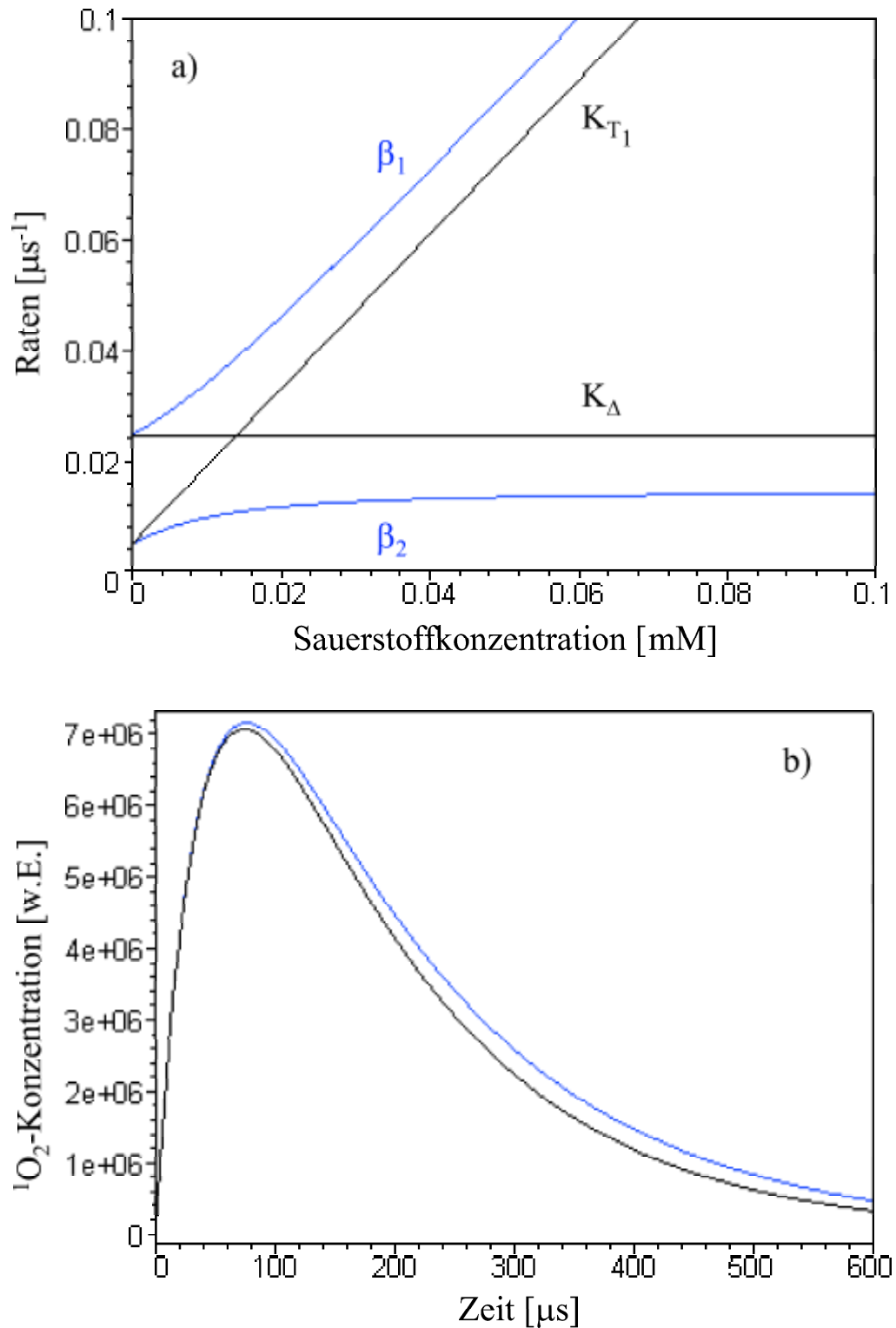


Abbildung 2.5: a) Anstiegs- und Abklingraten β_1 und β_2 für $k_{\Delta T_1} > 0$ (blau) sowie Anstiegs- und Abklingraten K_{T_1} und K_Δ für $k_{\Delta T_1} = 0$ (schwarz) der Singulett-Sauerstoff-Konzentration in Abhängigkeit der Sauerstoffkonzentration, b) zugehöriger Zeitverlauf der Singulett-Sauerstoff-Konzentration für eine Sauerstoff-Konzentration von 0,01 mM (siehe a))

2.5 Quantenausbeute

Vernachlässigt man aufgrund der kurzen Lebensdauer des S_1 -Zustandes des Photosensibilisators einen Energietransfer von diesem auf Sauerstoff, so gilt nach [WHR95] für die Quantenausbeute an Singulett-Sauerstoff:

$$\Phi_{\Delta}([O_2]) = \Phi_{T_1} f_{\Delta}^{T_1} P_{T_1}([O_2]) \quad (2.25)$$

Hierbei ist Φ_{T_1} die Triplett- T_1 -Quantenausbeute des Photosensibilisators, gegeben durch (siehe Abbildung 2.4 auf Seite 28):

$$\Phi_{T_1} = \frac{K_{ISC}}{K_{S_1}} \quad (2.26)$$

wobei $K_{S_1} = \frac{1}{\tau_{S_1}}$ die Gesamtrelexationsrate des Singulett- S_1 -Zustandes des Photosensibilisators ist. Der Anteil an T_1 -Zuständen, die durch die Wechselwirkung mit Sauerstoff deaktiviert werden und dabei Singulett-Sauerstoff erzeugen, ist gegeben durch:

$$f_{\Delta}^{T_1} = \frac{k_{T_1\Delta}}{k_{T_1O_2}} \quad (2.27)$$

Der Anteil der T_1 -Zustände, die durch die Wechselwirkung mit Sauerstoff relaxieren, ist von der Sauerstoff-Konzentration abhängig und gegeben durch:

$$P_{T_1}([O_2]) = \frac{k_{T_1O_2} [O_2]}{K_{T_1}} \quad (2.28)$$

wobei K_{T_1} durch Gleichung (2.13) gegeben ist. Somit ist:

$$\Phi_{\Delta}([O_2]) = \Phi_{T_1} \frac{k_{T_1\Delta} [O_2]}{K_{T_1}} \quad (2.29)$$

Diese Definition der Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute Φ_{Δ} , gegeben durch Gleichung (2.26), ist jedoch nur haltbar für den Fall, daß $k_{\Delta T_1} = 0$ gilt, da für $k_{\Delta T_1} > 0$ in der Lösung der Differentialgleichung (2.11) und (2.12) β_1 anstelle von K_{T_1} und β_2 anstelle von K_{Δ} tritt.

Um für den Fall, daß $k_{\Delta T_1} > 0$ ist, eine sinnvolle Definition der Quantenausbeute Φ_{Δ} zu finden, werden folgende Überlegungen angestellt. Betrachtet sei die mittlere Konzentration des Singulett-Sauerstoffs innerhalb dessen Lebensdauer $\tau_{\Delta} = \frac{1}{K_{\Delta}}$, zunächst für $k_{\Delta T_1} = 0$ (siehe auch Gleichung (2.24)):

$$\begin{aligned} \frac{1}{\tau_{\Delta}} \int_0^{\infty} [^1O_2] dt &= K_{\Delta} [T_1]_0 \int_0^{\infty} \frac{k_{T_1\Delta} [O_2]}{K_{T_1} - K_{\Delta}} (e^{-K_{\Delta}t} - e^{-K_{T_1}t}) dt = \\ &= K_{\Delta} [T_1]_0 \frac{k_{T_1\Delta} [O_2]}{K_{T_1} K_{\Delta}} = [T_1]_0 f_{\Delta}^{T_1} P_{T_1}([O_2]) \end{aligned} \quad (2.30)$$

Analog gilt für $k_{\Delta T_1} > 0$ (siehe auch Gleichung (2.12)):

$$\beta_2 \int_0^\infty [^1O_2] dt = \beta_2 [T_1]_0 \int_0^\infty \frac{k_{T_1 \Delta} [O_2]}{\beta_1 - \beta_2} (e^{-\beta_2 t} - e^{-\beta_1 t}) dt = \beta_2 [T_1]_0 \frac{k_{T_1 \Delta} [O_2]}{\beta_1 \beta_2} \quad (2.31)$$

Der Vergleich von Gl. (2.30) und (2.31) zeigt, daß also folgende Definition von $f_{\Delta}^{T_1} P_{T_1}([O_2])$ sinnvoll ist:

$$f_{\Delta}^{T_1} P_{T_1}([O_2]) = \frac{k_{T_1 \Delta} [O_2]}{\beta_1} \quad (2.32)$$

Somit ist die Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute für $k_{\Delta T_1} > 0$ wie folgt gegeben:

$$\Phi_{\Delta}([O_2]) = \Phi_{T_1} \frac{k_{T_1 \Delta} [O_2]}{\beta_1} \quad (2.33)$$

Zur Verdeutlichung des Unterschieds der Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute Φ_{Δ} für die Fälle $k_{\Delta T_1} > 0$ und $k_{\Delta T_1} = 0$ zeigt Abbildung 2.6 diese für $k_{\Delta T_1} = 0$ (schwarz) und für $k_{\Delta T_1} > 0$ (blau). Hierzu wurden für die blaue Kurve ($k_{\Delta T_1} > 0$) wieder sämtliche Relaxationsraten und -ratenkonstanten von Photofrin[®] verwendet, außerdem $k_{T_1 \Delta} = k_{T_1 O_2}$ [KMS01]. Für die schwarzen Kurven ($k_{\Delta T_1} = 0$) wurde $k_{\Delta T_1} = 0$ gesetzt und die übrigen Raten und Ratenkonstanten belassen.

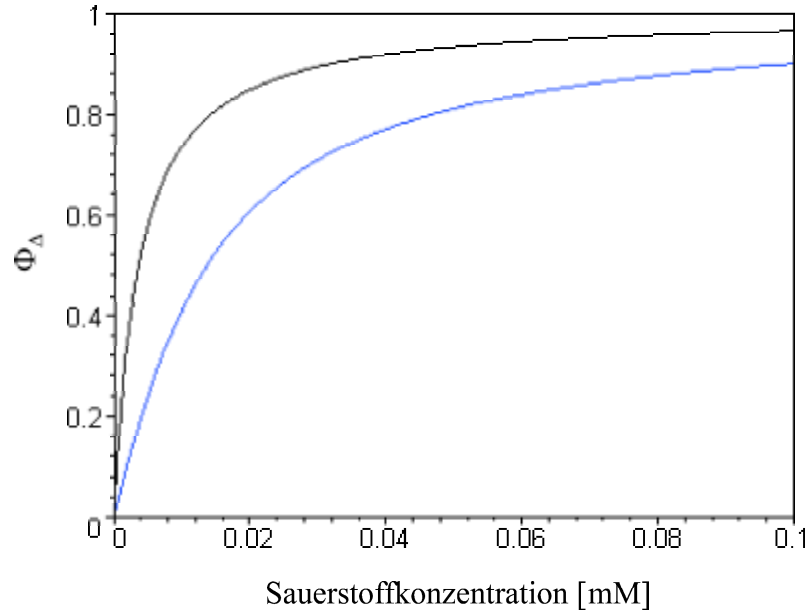


Abbildung 2.6: Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeuten Φ_{Δ} für $k_{\Delta T_1} = 0$ (schwarz) und für $k_{\Delta T_1} > 0$ (blau)

Wie man erkennt, ist der Anstieg der Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute im Falle eines Energie-Rücktransfers ($k_{\Delta T_1} > 0$) wesentlich flacher als ohne ($k_{\Delta T_1} = 0$).

Im folgenden seien noch in Tabelle 2.1 Literaturwerte der Triplett- T_1 -Quantenausbeuten Φ_{T_1} sowie der Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeuten Φ_{Δ} der in Kapitel 3 vorgestellten und im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Photosensibilisatoren gezeigt. Es sei jedoch ausdrücklich erwähnt, daß bei allen Literaturstellen keine explizite Angabe zur Sauerstoffkonzentration in Lösung gemacht wird.

Photosensibilisator	Φ_{T_1}	Φ_{Δ}
8-MOP	0,14 ¹ [BLS78]	0,01 ¹ [G94a]
	0,06 ¹ [G94a]	0,02 ² [P91]
	0,06 ¹ [P91]	0,035 ³ [BG87]
	0,06 ¹ [MAB79]	
ATMPn	0,43 ⁴ [BMM97]	0,37 ⁴ [BMM97]
Bengalrosa	≈ 1 ¹ [LR87]	0,75 ¹ [GLV83]
	0,86 ⁵ [GLV83]	0,86 ⁵ [GLV83]
	0,78 ¹ [R91]	0,81 ¹ [R91]
		0,76 ⁶ [GS64]
PPIX-DME	0,8 ⁷ [STT80]	—
Photofrin [®]	0,74 ¹ [PT86]	0,36 ¹ [PT86]
ICG-NaI	0,17 ⁸ [RPG97]	—
	0,16 ⁶ [RPG97]	
	0,14 ¹ [RPG97]	
	0,11 ⁹ [RPG97]	

Tabelle 2.1: Triplett- T_1 -Quantenausbeuten Φ_{T_1} sowie Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeuten Φ_{Δ} der im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Photosensibilisatoren (soweit bekannt); Lösungsmittel: ¹: Wasser (H₂O), ²: schweres Wasser (D₂O), ³: PBD, ⁴: Toluol, ⁵: Ethanol, ⁶: Methanol, ⁷: Benzol, ⁸: DMSO, ⁹ Lösung von 50 $\frac{g}{l}$ Albumin in Wasser

2.6 Motivation dieser Arbeit

Die Auswahl der oben genannten Photosensibilisatoren aus der Vielzahl möglicher Singulett-Sauerstoff-Generatoren erfolgte im wesentlichen anhand von Zulassungsgesichtspunkten, d. h. es wurden lediglich solche Photosensibilisatoren ausgewählt, die als Medikament zur klinischen Anwendung zugelassen sind oder sich im Zulassungsverfahren befinden (vergleiche auch Tabelle 1.1 auf Seite 8). Die einzige Ausnahme stellt das Bengalrosa dar, das weder eine klinische Zulassung besitzt noch sich in irgendwelchen Studien der Phase I - III befindet. Bengalrosa wurde jedoch ebenfalls hinzugenommen, da es zum einen in der bisherigen Literatur zu photophysikalischen Untersuchungen zur Erzeugung und Relaxation von Singulett-Sauerstoff eine Art Standard-Singulett-Sauerstoff-Generator darstellt, so daß die Leistungsfähigkeit der im Rahmen dieser Arbeit zum Einsatz kommenden Detektionseinheit abgeschätzt werden kann. Desweiteren ist Bengalrosa sowohl in wäßrigen wie auch in alkoholischen Lösungsmitteln sehr gut löslich, wohingegen sich die anderen verwendeten Photosensibilisatoren zum Teil lediglich in einer der beiden Umgebungen gut lösen lassen, so daß anhand des Bengalrosas auch der Einfluß der Umgebung bzw. des Lösungsmittels auf die Erzeugung von Singulett-Sauerstoff gezeigt werden kann.

Zur Detektion des Singulett-Sauerstoffs ist der direkte Nachweis über dessen Lumineszenz bei 1270 nm den indirekten Methoden vorzuziehen, da bei letzteren zusätzliche Substanzen, die chemisch durch Singulett-Sauerstoff auf eine definierte Weise verändert werden, involviert werden müssen. Eine wesentliche Schwierigkeit bei der Spektroskopie der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz bestand bisher jedoch in der geringen Empfindlichkeit der verwendeten Detektoren (Standard-Photomultiplier, Germaniumdetektoren). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird ein neuartiger Photomultiplier mit einer hohen Sensitivität und hervorragendem Signal-Rausch-Verhältnis eingesetzt, wobei in Verbindung mit einer schnellen Zähleinrichtung ebenfalls eine hohe Zeitauflösung erreicht wird. Dadurch kann der spektroskopische Nachweis von Singulett-Sauerstoff entscheidend verbessert werden, so daß u. a. die erstmalige Detektion der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz bei verschiedenen, insbesondere bei erniedrigten, d. h. physiologisch relevanteren Sauerstoff-Konzentrationen versucht werden kann und damit sämtliche relevanten Ratenkonstanten des zugrundegelegten Modells der Erzeugung und Relaxation des Singulett-Sauerstoffs (siehe Abbildung 2.3 auf Seite 25) einer einzigen experimentellen Nachweismethode zugänglich gemacht werden. Desweiteren kann ebenfalls aufgrund der verbesserten experimentellen Bedingungen der zweifelsfreie spektroskopische Nachweis von Singulett-Sauerstoff *in vitro* versucht werden, und zwar sowohl unter Verwendung von schwerem Wasser, als auch – anders als bisher in der Literatur üblich – mit normalem Wasser.

Kapitel 3

Experimentelle Methoden

3.1 Generierung von Singulett-Sauerstoff in homogenen Lösungen

Im folgenden seien nun die in homogenen Lösungen verwendeten Photosensibilisatoren beschrieben, wobei hier bei jedem einzelnen zunächst auf medizinisch-biologische Anwendungen eingegangen sowie die Präparation der Lösungen und die Erzeugung von Singulett-Sauerstoff detailliert erklärt wird. Als Lösungsmittel wurden schweres Wasser (Deuteriumoxid, D_2O) und deuteriertes Ethanol (C_2H_5OD , EtOD) verwendet – letzteres nur dann, wenn die Löslichkeit des Photosensibilisators in wässriger Umgebung zu gering ist. Durch die Verwendung von deuterierten Lösungsmitteln wird eine größere Abklingdauer, d. h. nach $\tau_\Delta = \frac{1}{k_\Delta}$ eine geringere Abklingrate des Singulett-Sauerstoffs ($\tau_\Delta(H_2O) = 3,5 \mu s$ [WHR95], $\tau_\Delta(D_2O) = 67 \pm 3 \mu s$ [EKM02], $\tau_\Delta(EtOH) = 13 \mu s$ [WHR95], $\tau_\Delta(EtOD) = 31 \pm 2 \mu s$ [BME02]) und damit nach Gleichungen (2.9) auf Seite 25 und (2.19) auf Seite 28 bzw. (2.23), (2.24) auf Seite 29 auch eine höhere Lumineszenzintensität erreicht. Die gezeigten Absorptionskoeffizientenspektren der Photosensibilisatoren wurden aus Transmissionsspektren, aufgenommen mit einem Einstrahl-Spektrophotometer (DU-640, Beckman Instruments, München), berechnet. Für alle Lumineszenzexperimente wurden die präparierten Lösungen zur Bestrahlung in eine Durchfluß-Küvette (QS-1000, Hellma Optik, Jena) gefüllt.

3.1.1 8-Methoxypsoralen

Das Psoralenderivat 8-Methoxypsoralen (8-MOP) ist, wie bereits in Kapitel 1 erwähnt, ein weit verbreitetes Medikament u. a. zur Behandlung von Schuppenflechte. Abbildung 3.1 zeigt die Strukturformel von 8-MOP:

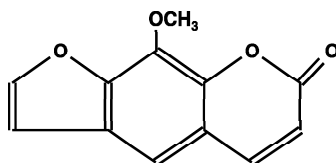


Abbildung 3.1: Chemische Struktur von 8-Methoxypsoralen [G94b]

Die Löslichkeit von 8-MOP ($m_M = 216,2 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$, Reinheit 99 %, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) in Wasser ist sehr gering. Sie beträgt nach [G94a] $1,67 \cdot 10^{-4}$ M, nach [G94b] sogar nur $1,06 \cdot 10^{-4}$ M. Da zu erwarten ist, daß die Löslichkeit von 8-MOP in D_2O nicht um Größenordnungen größer sein wird als in Wasser, kann die zur Verfügung stehende Analysenwaage (H54AR, Mettler, Gießen) nicht zur Probenpräparation verwendet werden, da die zur Herstellung einiger Milliliter Lösung von 8-MOP in D_2O benötigten Substanzmengen nur zu grob abgewogen werden können (Der Kleinstwert der Fehlergrenze liegt bei dieser Analysenwaage bei 50 μg).

Zur Herstellung der 8-MOP-Lösungen wurden deshalb einige der 8-MOP-Kristallite in D_2O (Carl Roth & Co., Karlsruhe, Reinheit 99,7 atom-%) gegeben und diese Suspension dann für eine Zeitdauer von 15 Minuten in ein Ultraschallbad (RK102, Bandelin Electronic GmbH & Co. KG, Berlin) gestellt. Der Absorptionskoeffizient dieser Lösung wird in Abhängigkeit der Wellenlänge gemessen und bei einer bestimmten Wellenlänge (hier 305 nm) mit dem einer Lösung bekannter Konzentration verglichen. Diese wurde einmalig so präpariert, indem ein so großes Volumens an D_2O verwendet wurde, daß eine noch lösliche Menge an 8-MOP eingewogen werden konnte. Der Absorptionsquerschnitt von 8-MOP in D_2O bei der ausgewählten Wellenlänge kann über die Lösung bekannter Konzentration unter Verwendung folgender Relation berechnet werden:

$$\alpha(\lambda) = \sigma(\lambda) \cdot N \quad (3.1)$$

Hierbei ist $\alpha(\lambda)$ der wellenlängenabhängige Absorptionskoeffizient pro cm, $\sigma(\lambda)$ der Absorptionsquerschnitt in cm^2 für die jeweilige Wellenlänge und N die Teilchenzahl pro cm^3 . Bei bekanntem Absorptionsquerschnitt läßt sich dann die gesuchte Konzentration einer Lösung mit Hilfe ihres Absorptionskoeffizienten berechnen. Verfährt man wie oben beschrieben, so ergibt sich die 8-MOP-Konzentration der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten, als gesättigt betrachteten Lösungen zu $[8\text{-MOP}] = 1,37 \cdot 10^{-4}$ M. Dieser Wert liegt zwischen den beiden angegebenen Literaturwerten der Löslichkeit von 8-MOP in H_2O (s. o.).

Um geringere Konzentrationen von 8-MOP in D_2O zu erreichen, werden die so hergestellten Lösungen mit reinem D_2O verdünnt. Es sei nochmals ausdrücklich darauf hingewiesen, daß alle in dieser Arbeit vorkommenden, sich auf 8-MOP beziehenden Konzentrationsangaben in dieser Weise zustande kommen. Die Verdünnung der gesättigten 8-MOP-Lösungen mit reinem D_2O hat unmittelbar vor der Messung zu erfolgen, um zu vermeiden, daß eventuell in der Lösung vorhandene, nicht sichtbare Mikrokristallite in Lösung gehen und so die Konzentration von 8-MOP ungewollt erhöht wird.

Abbildung 3.2 zeigt den Absorptionsquerschnitt von 8-MOP in D_2O in Abhängigkeit der Wellenlänge. Zu erkennen sind die ausgeprägten Absorptionsbanden im ultravioletten Spektralbereich sowie das völlige Fehlen einer Absorption im Sichtbaren und nahen Infrarot.

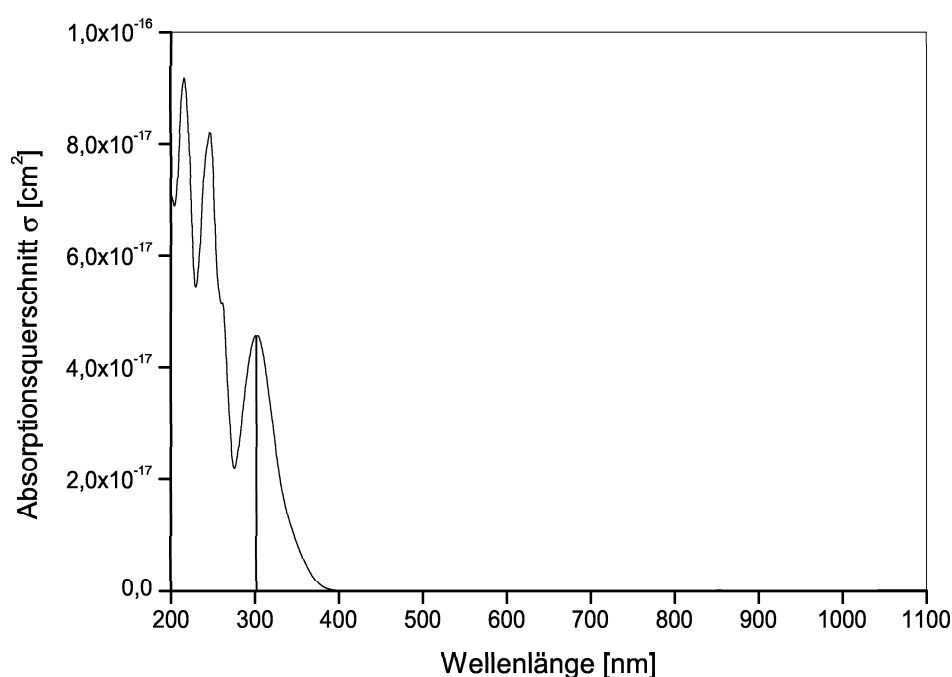


Abbildung 3.2: Absorptionsquerschnitt von 8-MOP in D_2O in Abhängigkeit der Wellenlänge; zusätzlich eingezeichnet die verwendete Anregungswellenlänge bei 305 nm (s.u.)

Die optische Anregung von 8-MOP erfolgte durch einen frequenzverdoppelten Farbstofflaser (Spectron Laser, Warwickshire, Großbritannien), der durch einen ebenfalls frequenzverdoppelten Nd:YAG-Laser (Spectron) mit einer Pulsrepetitionsrate von 10 Hz und einer Pulsdauer von 12 ns gepumpt wurde. Die maximalen Pulsenergien des so erzeugten Laserstrahls zur Anregung von 8-MOP betrugen 2,5 mJ bei einer Anregungswellenlänge von 305 nm. Abbildung 3.3 auf Seite 40 zeigt den verwendeten

experimentellen Aufbau zur Generierung von Singulett-Sauerstoff durch photoaktiviertes 8-MOP. Gezeigt sind der Nd:YAG-Laser, der Farbstoff-Laser sowie die Frequenzverdopplungseinheit FD zur Generierung der Pulse der Wellenlänge 305 nm. Zur Erhöhung der Konversionseffizienz wird mit Hilfe der Linse L_1 der aus dem Farbstoff-Laser austretende Strahl leicht in den KDP-Kristall der Frequenzverdopplungseinheit fokussiert. Der aus dieser austretende Strahl wird über die beiden UV-Umlenkspiegel US, durch welche die nicht-frequenzverdoppelten Strahlanteile bei 610 nm von den Anteilen bei 305 nm absepariert werden, zur Küvette K hin gerichtet. Vor dem Auftreffen auf die Küvette wird der 305 nm-Strahl noch mit Hilfe der Linse L_2 leicht aufgeweitet, um ein größeres Volumen anzuregen und die Anregungsintensität zu erniedrigen.

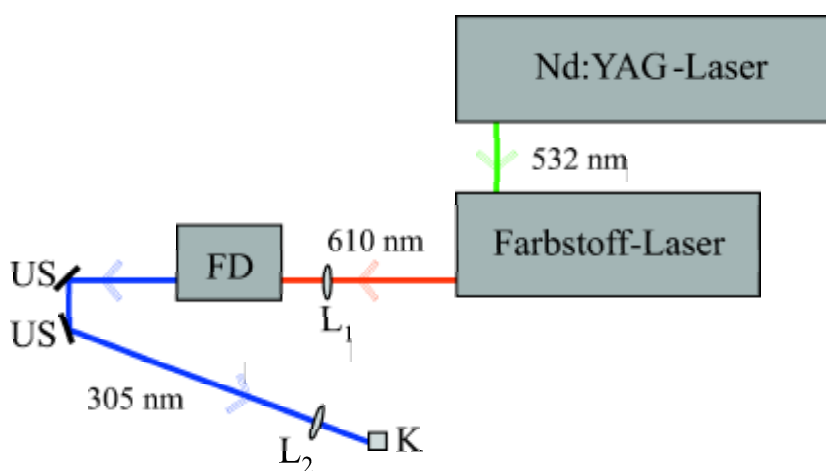


Abbildung 3.3: Experimenteller Aufbau zur optischen Anregung von 8-Methoxypsoralen; FD: Frequenzverdopplungseinheit, US: Umlenkspiegel, $L_{1,2}$: Linsen, K: Küvette

Die durch das Aufweiten des Laserstrahls erniedrigte Intensität betrug etwa $10^5 \frac{\text{W}}{\text{cm}^2}$, wohingegen die Sättigungsintensität für den Übergang $S_0 \rightarrow S_1$ (siehe Seite 27) bei 8-MOP mit einer Fluoreszenzlebensdauer von einigen wenigen Nanosekunden [ACD85] und einem Absorptionsquerschnitt von $4,5 \cdot 10^{-17} \text{ cm}^2$ bei 305 nm (siehe Abbildung 3.2) etwa $10^7 \frac{\text{W}}{\text{cm}^2}$ beträgt. Somit ist die beim Übergang von Gleichung (2.12) zu (2.14) und von Gleichung (2.13) zu (2.15) auf Seite 27 gemachte Näherung gerechtfertigt.

An dieser Stelle sei noch erwähnt, daß im Rahmen der Singulett-Sauerstofferzeugung durch 8-MOP neben der reinen Photodegradation des 8-MOP-Moleküls auch eine selbstsensibilisierte Photooxidation stattfindet, so daß bis zu sechs Photoprodukte des 8-MOP-Moleküls gebildet werden können, wobei nicht genau bestimmt ist, welche einer reinen Photodegradation und welche einer reinen Photooxidation zuzuschreiben sind [LAS82, WB82]. Abbildung 3.4 auf Seite 41 zeigt den vorgeschlagenen Mechanismus der Bildung des Hauptphotoprodukts von 8-MOP, welches als 6-Formyl-5-Hydroxy-8-Methoxycoumarin identifiziert wurde [LAS82]. Daraus resultieren zweierlei Konsequen-

zen für im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente. Zum einen hat dies insofern eine Auswirkung auf die Probenpräparation und -lagerung, als darauf geachtet werden muß, daß die Lösungen vor Beginn der Experimente möglichst wenig Licht ausgesetzt werden. Zum anderen können sich möglicherweise die Photoprodukte von 8-Methoxypsoralen zusätzlich zum nativen 8-MOP als Singulett-Sauerstoff-Quencher erweisen, wobei jedoch die das Quenching des Singulett-Sauerstoffs durch 8-MOP beschreibende Ratenkonstante $k_{\Delta P}$ keine Unterscheidung der einzelnen Degradationsprozesse erlaubt.

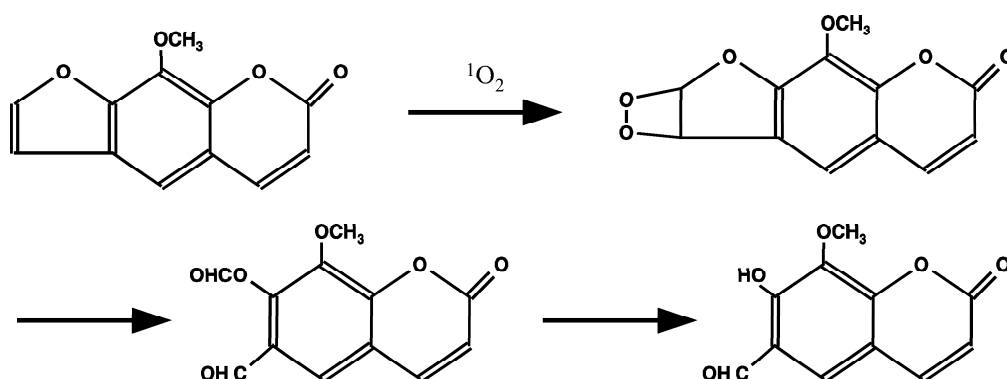


Abbildung 3.4: Formation des Hauptphotoprodukts von 8-Methoxypsoralen, 6-Formyl-5-Hydroxy-8-Methoxycoumarin, nach [WB82]

3.1.2 9-acetoxy-2,7,12,17-tetrakis-(β -methoxyethyl)-Porphycen (ATMPn)

Bei 9-acetoxy-2,7,12,17-tetrakis-(β -methoxyethyl)-Porphycen (ATMPn) handelt es sich um ein Strukturisomer von Porphin, der Stammverbindung aller Porphyrine. Abbildung 3.5 auf Seite 42 zeigt die chemische Struktur von ATMPn. Das ATMPn ist ebenfalls ein Typ II-Photosensibilisator [BMM97] und wurde bereits sowohl *in vitro* [SKA96, FAK99] als auch *in vivo* [KSE97, ASS97] getestet, wobei es sich *in vitro* als wirksamer herausgestellt hat als z. B. der klinisch verwendete Photosensibilisator 5-Aminolävulinsäure (s. u.) [KSE97]. Desweiteren verursacht es, systemisch verabreicht, eine geringere generalisierte Photosensibilisierung wie Photofrin® [ASS97].

Zur Präparation der Lösungen von ATMPn ($m_M = 601 \frac{g}{mol}$, Institut für anorganische Chemie, Universität Köln) wurde die für eine Photosensibilisator-Konzentration von $100 \mu M$ nötige Stoffmenge mit Hilfe einer Analysenwaage (Mettler) abgewogen und die dazugehörige Menge an EtOD mit Hilfe eines Mikropipettierers zugegeben. Um ein vollständiges Auflösen von ATMPn in EtOD zu erreichen, wurden die Lösungen

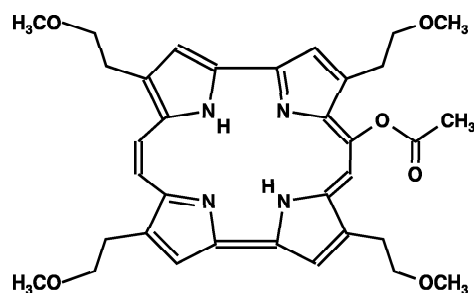


Abbildung 3.5: Strukturformel von ATMPn [BMM97]

für eine Zeitdauer von 15 Minuten in ein Ultraschallbad (Bandelin) gestellt. Dünnere Lösungen wurden über eine Verdünnungsreihe hergestellt.

Abbildung 3.6 zeigt den Absorptionsquerschnitt von ATMPn in EtOD in Abhängigkeit der Wellenlänge. Zu erkennen ist eine ausgeprägte Absorptionsbande im UV, desweiteren die Absorption im grünen und roten Spektralbereich.

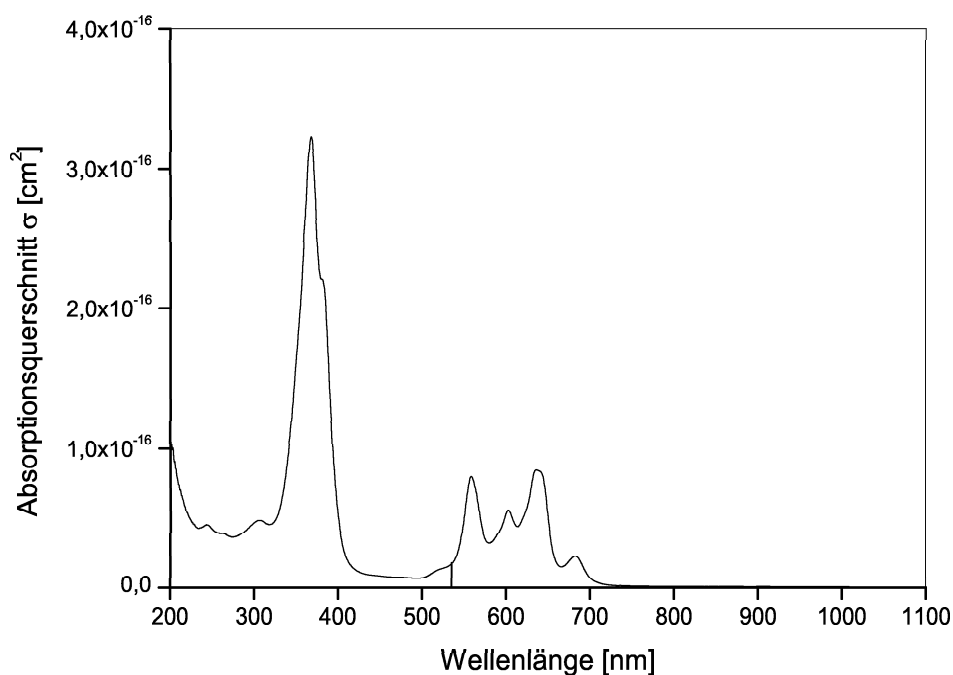


Abbildung 3.6: Absorptionsquerschnitt von ATMPn in EtOD in Abhängigkeit der Wellenlänge; zusätzlich eingezeichnet die verwendete Anregungswellenlänge bei 532 nm (s.u.)

Die optische Anregung von ATPMn erfolgte über einen linear polarisierten, frequenzverdoppelten Nd:YAG-Laser (LC532-II, Solar, Minsk, Belarus) mit einer Pulsrepetitionsrate von 1,67 kHz und einer Pulsdauer von 150 ns. Die verwendeten Pulsenergien des so erzeugten Laserstrahls zur Anregung von ATPMn betrugen $30 \mu\text{J}$ bei einer Laserwellenlänge von 532 nm. Abbildung 3.7 zeigt den experimentellen Aufbau zur Generierung von Singulett-Sauerstoff durch photoaktiviertes ATPMn. Gezeigt sind der verwendete Nd:YAG-Laser, die Umlenkspiegel US, der Glan-Taylor-Polarisator GTP, mit dessen Hilfe sich die Pulsenergie einstellen lässt bevor der Strahl auf die Küvette K trifft, sowie das Glasplättchen GP, dessen Reflex auf die zum Triggern verwendete Photodiode PD gerichtet wurde.

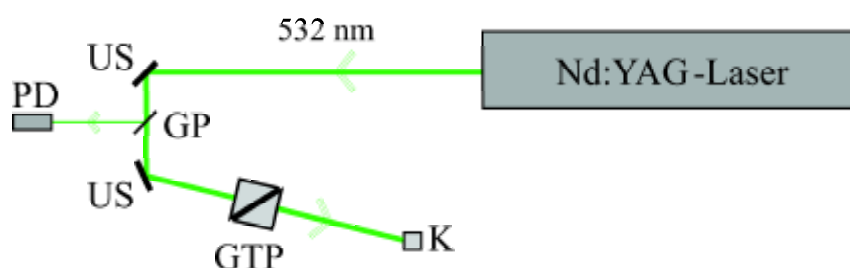


Abbildung 3.7: Experimenteller Aufbau zur optischen Anregung von ATPMn; US: Umlenkspiegel, GTP: Glan-Taylor-Polarisator, K: Küvette, GP: Glasplättchen, PD: Photodiode

Die Fluoreszenzlebensdauer von Porphycenen beträgt etwa 10 ns in Methanol und Dichlormethan [ARN96]. Nimmt man dieselbe Größenordnung für die Fluoreszenzlebensdauer von ATPMn in EtOD an, so beträgt die Sättigungsintensität (siehe Seite 27) für den $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergang mit einem Absorptionsquerschnitt von $5,5 \cdot 10^{-17} \text{ cm}^2$ bei 532 nm (siehe Abbildung 3.6 auf Seite 42) etwa $10^5 \frac{\text{W}}{\text{cm}^2}$. Die Intensität des Laserstrahls betrug lediglich etwa $10^2 \frac{\text{W}}{\text{cm}^2}$. Somit ist ebenso wie bei 8-MOP die beim Übergang von Gleichung (2.12) zu (2.14) und von Gleichung (2.13) zu (2.15) auf Seite 27 gemachte Näherung gerechtfertigt.

3.1.3 Protoporphyrin IX

5-Aminolävulinsäure (5-ALA) ist bereits ein zugelassenes Medikament zur Behandlung einiger dermatologischer Erkrankungen. Jedoch ist 5-ALA nicht der eigentliche Photosensibilisator, sondern das Protoporphyrin IX (PPIX) [SDA01], welches erst im Rahmen der Häm-Biosynthese in den Mitochondrien¹ und im Zytosol² der inkubierten Zellen aus 5-Aminolävulinsäure entsteht [E94, B01b]. Somit ist, im Gegen-

¹Zellorganellen, deren Aufgabe die Energiegewinnung durch Oxidation verschiedener Nährstoffe in der Zelle ist [P94]

²Grundplasma der Zelle [P94]

satz zu Photofrin[®], das Protoporphyrin IX ein endogener Photosensibilisator. Es ist nicht genau bekannt, ob Protoporphyrin IX hauptsächlich ein Typ I- oder ein Typ II-Photosensibilisator ist, jedoch überleben von mit Protoporphyrin IX inkubierten und bestrahlten Zellen mehr durch zusätzlicher Inkubation mit β -Carotin als mit α -Tocopherol, wobei es sich bei ersterem um einen stärkeren Deaktivator von Singulett-Sauerstoff handelt als bei letzterem [BEF01], so daß es sich bei Protoporphyrin IX ebenfalls um einen Typ II-Photosensibilisator handeln könnte.

Desweiteren wird zumindest in wässrigen Lösungen das Aggregationsverhalten von Protoporphyrin IX durch den pH-Wert beeinflusst: Bei einem pH-Wert von Null bis drei liegt es als Monomer vor, während es bei einem pH-Wert größer als acht Dimere und im Bereich pH 3 bis pH 7 höhere Aggregate bildet [SCR02]. Abbildung 3.8 zeigt die chemische Struktur des linearen 5-Aminolävulinsäure-Moleküls (a) sowie des Protoporphyrin IX-Dimethylester-Moleküls (b).

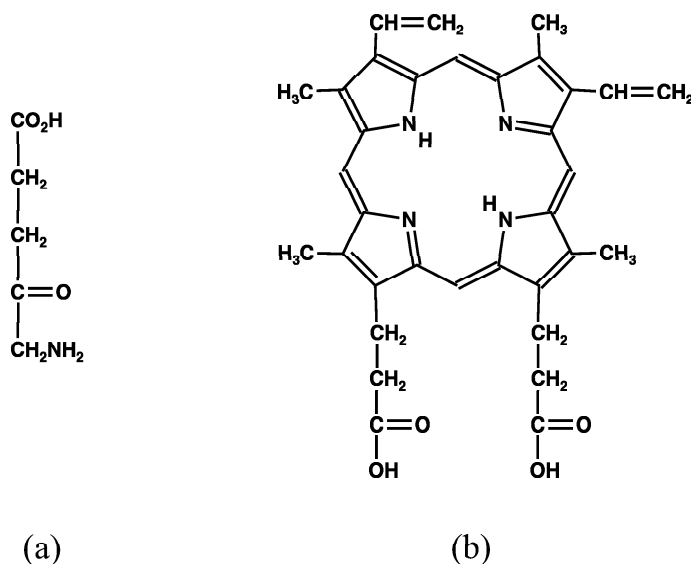


Abbildung 3.8: Strukturformel von 5-Aminolävulinsäure (a) und Protoporphyrin IX-Dimethylester (b) [E94, PT86]

Lösungen von Protoporphyrin IX-Dimethylester (PPIX-DME, $m_M = 590,7 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$, Reinheit 95 %, Sigma) in EtOD wurden analog zu den Lösungen von ATMPn in EtOD präpariert, wobei die Standardlösung eine Konzentration von $300 \mu\text{M}$ PPIX-DME enthält. Geringere PPIX-DME-Konzentrationen wurden wieder durch eine Verdünnungsreihe erhalten.

Abbildung 3.9 auf Seite 45 zeigt den Absorptionsquerschnitt von PPIX-DME in EtOD in Abhängigkeit der Wellenlänge. Zu erkennen sind Absorptionsbanden im UV sowie die Absorption im sichtbaren und nahen infraroten Spektralbereich.

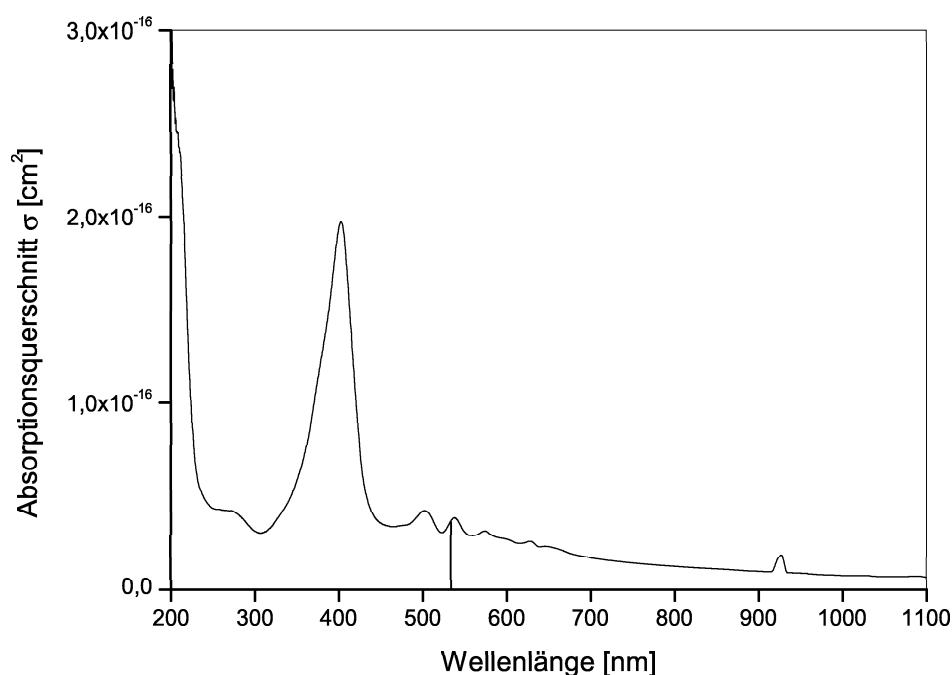


Abbildung 3.9: Absorptionsquerschnitt von PPIX-DME in EtOD in Abhängigkeit der Wellenlänge; zusätzlich eingezeichnet die verwendete Anregungswellenlänge bei 532 nm

Die optische Anregung von PPIX-DME erfolgte ebenfalls analog zu ATMPn (siehe Abbildung 3.7) mit identischer Wellenlänge, Repetitionsrate und gleicher Intensität von etwa $10^2 \frac{\text{W}}{\text{cm}^2}$.

Benutzt man zur Berechnung der Sättigungsintensität von PPIX-DME in EtOD die Fluoreszenzlebensdauer des PPIX-DME-Moleküls in Benzol von etwa 23 ns [CAM77], so ergibt diese sich unter Benutzung des Absorptionsquerschnittes bei 532 nm von $2,6 \cdot 10^{-17} \text{ cm}^2$ (siehe Abbildung 3.9) zu etwa $10^6 \frac{\text{W}}{\text{cm}^2}$. Auch hier ist also die beim Übergang von Gleichung (2.12) zu (2.14) und von Gleichung (2.13) zu (2.15) auf Seite 27 gemachte Näherung gerechtfertigt.

3.1.4 2,4,5,7-tetraiodo-3',4',5',6'-Tetrachlorfluorescein (Bengalrosa)

2,4,5,7-tetraiodo-3',4',5',6'-Tetrachlorfluorescein wurde erstmalig synthetisiert, um die Farbe des roten Flecks, welchen verheiratete Bengali Frauen im Haar tragen, nachzuahmen und in Anlehnung dazu Bengalrosa genannt [N89]. Hierbei handelt es sich um einen Farbstoff der Xanthen-Gruppe, der keinerlei wirtschaftliche Bedeutung besitzt, obwohl z. B. die verwandte Substanz Erythrosin zum Einfärben von Maraschino Kirschen verwendet wird [N89]. Desweiteren werden Derivate des Fluoresceins, eines weiteren

Xanthen-Farbstoffs, als diagnostische Proben verwendet [N89]. Da jedoch der Triplett- T_1 -Zustand von Bengalrosa nahezu komplett durch Energieübertrag auf molekularen Sauerstoff relaxiert [N89] und dadurch massiv Singulett-Sauerstoff [HC87, ART96] sowie Superoxid anion [SPW78, LST90, LK96, LK97] und weitere reaktive Sauerstoffspezies [BLC91, RCK95] generiert werden, wurde es für zahllose Experimente *in vitro* (z. B. [BBC85, BKC98]) verwendet und für die Desinfektion von Wasser im Rahmen der Trinkwasseraufbereitung vorgeschlagen [BBC85, SSF00]. Abbildung 3.10 zeigt die chemische Struktur von Bengalrosa.

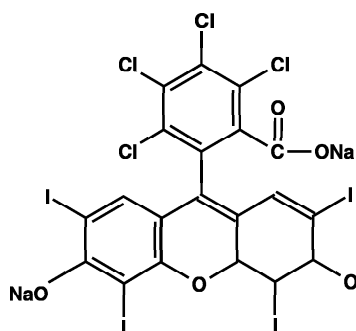


Abbildung 3.10: Strukturformel von Bengalrosa [N89]

Bengalrosa ($m_M = 1017,65 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$, Reinheit 95 %, Aldrich Chemical Co., Inc., Milwaukee, USA) wurde sowohl in D_2O , $D_2O:H_2O = 9:1$, wie auch in EtOD gelöst. Die Präparation erfolgte analog zu der von ATMPn in EtOD, jedoch genügte lediglich ein Schütteln der Lösungen, um ein vollständiges Auflösen zu erreichen. Die Konzentration der Standardlösung betrug $2 \mu\text{M}$, geringere Konzentrationen wurden wieder durch eine Verdünnungsreihe hergestellt.

Abbildung 3.11 auf Seite 47 zeigt den Absorptionsquerschnitt von Bengalrosa in EtOD (durchgezogen) und D_2O (gestrichelt) in Abhängigkeit der Wellenlänge. Zu erkennen ist neben der Absorption im UV die ausgeprägte Absorptionsbande im gelben Spektralbereich, wobei diese bei Verwendung von D_2O etwas kurzwelliger liegt als bei Verwendung von EtOD.

Die optische Anregung von Bengalrosa erfolgte analog zu der von ATMPn und PPIX-DME, es wurde lediglich eine Pulsenergie von $60 \mu\text{J}$ verwendet.

Die Fluoreszenzlebensdauer von Bengalrosa beträgt etwa $0,6 \text{ ns}$ in Methanol [RP96] und etwa $0,8$ bis $0,9 \text{ ns}$ in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) [LDF99, STP96]. Nimmt man etwa eine Nanosekunde für die Fluoreszenzlebensdauer von Bengalrosa in D_2O und EtOD an, so beträgt die Sättigungsintensität (siehe Seite 27) für den $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergang mit Absorptionsquerschnitten bei 532 nm von $2,0 \cdot 10^{-16} \text{ cm}^2$ in D_2O bzw. $1,3 \cdot 10^{-16} \text{ cm}^2$ in EtOD (siehe Abbildung 3.11) etwa $10^6 \frac{\text{W}}{\text{cm}^2}$. Die Intensität des Laserstrahls betrug lediglich etwa $10^3 \frac{\text{W}}{\text{cm}^2}$. Somit ist wiederum die beim Übergang

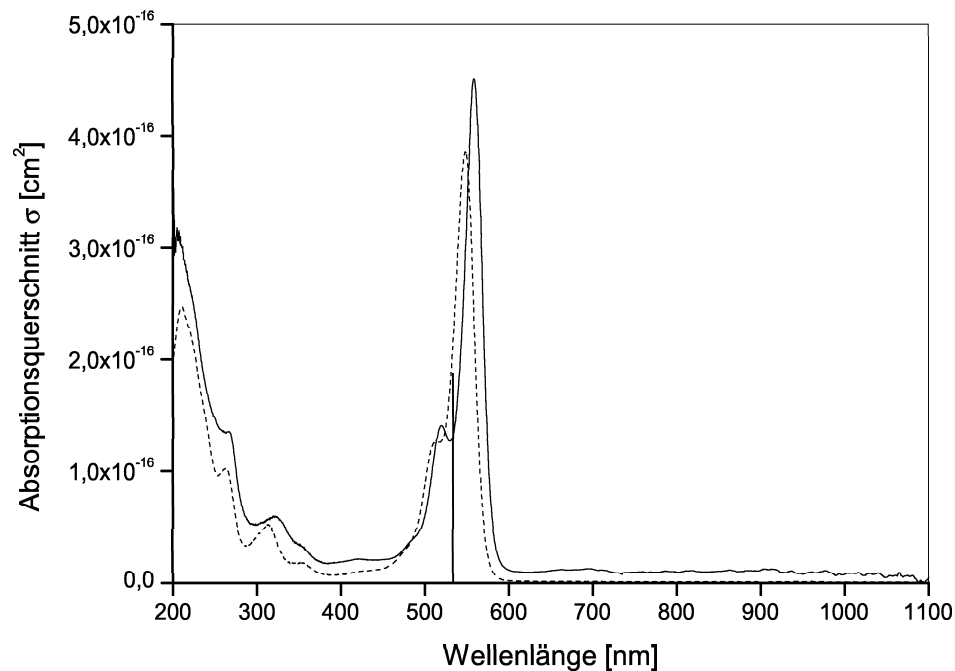


Abbildung 3.11: Absorptionsquerschnitt von Bengalrosa in EtOD (durchgezogen) und D_2O (gestrichelt) in Abhängigkeit der Wellenlänge; zusätzlich eingezeichnet die verwendete Anregungswellenlänge bei 532 nm

von Gleichung (2.12) zu (2.14) und von Gleichung (2.13) zu (2.15) auf Seite 27 gemachte Näherung gerechtfertigt.

3.1.5 Indocyaningrün

Indocyaningrün ist eine für die klinische Anwendung zugelassene Substanz zur Bestimmung von Leber- und Herzfunktion sowie des Plasmavolumens [FSB97, AKB98, O98]. Desweiteren wurde es bereits zur Darstellung von Gefäßstrukturen in der Netzhaut verwendet [SNT99]. In der Literatur wurde jedoch auch durch *in vitro* Experimente gezeigt, daß es sich bei dieser Substanz um einen Photosensibilisator vom Typ II handelt [FSB97, BAK99], so daß es bereits zur klinischen Behandlung einiger Tumore verwendet wurde [KAB97, AKB98]. Von Indocyaningrün ist bekannt, daß es in wässrigen Lösungen Dimere, sowie ab einer Konzentration von etwa 10^{-4} M, Oligomere bildet [PPB96, MPZ98]. Desweiteren bindet es an Albumin sowie Plasmaproteine, wodurch es wesentlich an Temperatur- und Photostabilität gewinnt [O98, HMP98].

Abbildung 3.12 zeigt die chemische Struktur von Indocyaningrün-NaI:

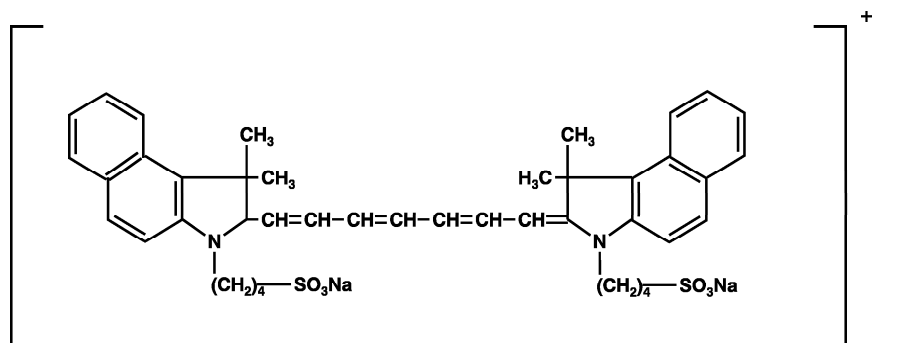


Abbildung 3.12: Strukturformel von Indocyaningrün-NaI [FSB97]

Indocyaningrün-Natriumiodid (ICG-NaI, $m_M = 924,9 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$, Pulsion Medizintechnik, München) wurde in Konzentrationen von $2 \mu\text{M}$ bis zu 1 mM sowohl in D_2O , Dimethylsulfoxid (DMSO), wie auch in $\text{D}_2\text{O} + 50 \frac{\text{g}}{\text{l}}$ humanes Serumalbumin ($m_M \approx 66000 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$ [P94], Sigma) gelöst. Die Präparation der Lösungen erfolgte wieder unter Benutzung der zur Verfügung stehenden Analysenwaage sowie eines Mikropipettierers zur Zugabe des jeweils benötigten Volumens Lösungsmittel. Um ein vollständiges Auflösen von ICG-NaI im jeweiligen Lösungsmittel zu erreichen, genügte es, die Lösungen kurz zu schütteln. Wie bereits erwähnt, bildet ICG-NaI in wässrigen Lösungen Dimere und Oligomere, so daß der Absorptionsquerschnitt konzentrationsabhängig ist. Gleiches gilt für ICG-NaI in wässrigen Albuminlösungen, da bei höheren ICG-NaI-Konzentrationen eine multiple Molekül-Adsorption an das Albumin stattfinden kann [PPB96]. Dies bedeutet, daß je nach verwendeter ICG-NaI-Konzentration in Lösung die Anregungswellenlänge entsprechend gewählt werden muß.

Die optische Anregung von ICG-NaI erfolgte durch einen Ti:Saphir-Laser (LX-331, Solar), welcher durch einen frequenzverdoppelten Nd:YAG-Laser (LC532-II, Solar) mit einer Pulsrepetitionsrate von $1,67 \text{ kHz}$ und einer Pulsdauer von 150 ns gepumpt wurde. Die verwendeten Pulsenergien des so erzeugten Laserstrahls zur Anregung von ICG-NaI betrugen maximal $120 \mu\text{J}$ bei Laserwellenlängen von 700 bzw. 790 nm . Abbildung 3.13 auf Seite 49 zeigt den experimentellen Aufbau zur Generierung von Singulett-Sauerstoff durch photoaktiviertes ICG-NaI. Gezeigt sind die verwendeten Laser Nd:YAG und Ti:Saphir, die Umlenkprismen UP, der Glan-Taylor-Polarisator GTP zum Einstellen der Pulsenergie, die Küvette K, sowie das Glasplättchen GP, dessen Reflex auf die zum Triggern verwendete Photodiode PD gerichtet wurde.

Die Fluoreszenzlebensdauer von ICG-NaI beträgt $20 \pm 5 \text{ ps}$ in Wasser, $580 \pm 40 \text{ ps}$ in DMSO und $200 \pm 10 \text{ ps}$ in wässriger Albuminlösung [RPG97]. Daraus berechnet sich eine minimale Sättigungsintensität (siehe Seite 27) in DMSO für den $S_0 \rightarrow S_1$ -

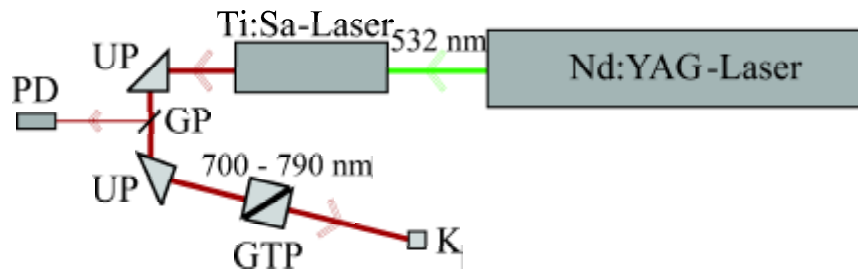


Abbildung 3.13: Experimenteller Aufbau zur optischen Anregung von ICG-NaI; UP: Umlenkprismen, GTP: Glan-Taylor-Polarisator, K: Küvette, GP: Glasplättchen, PD: Photodiode

Übergang von etwa $10^6 \frac{\text{W}}{\text{cm}^2}$ [RPG97]. Die Intensität des Laserstrahls betrug bei maximal verwendeter Pulsenergie lediglich etwa $10^3 \frac{\text{W}}{\text{cm}^2}$. Deshalb ist auch bei ICG-NaI die beim Übergang von Gleichung (2.12) zu (2.14) und von Gleichung (2.13) zu (2.15) auf Seite 27 gemachte Näherung gerechtfertigt.

3.2 Generierung von Singulett-Sauerstoff in heterogenen Suspensionen

Wie bereits in Kapitel 1 dargestellt, sind im Rahmen der Photosensibilisierung neben der Erzeugung von Singulett-Sauerstoff eine Vielzahl von photochemischen Reaktionen möglich, wobei in biologischen Systemen die Singulett-Sauerstoff-induzierte Photosensibilisierung wiederum auf verschiedenen Prozessen basieren kann [ANF01, BGK99, BT93]. Deshalb ist es notwendig, die Erzeugung und Relaxation von Singulett-Sauerstoff in komplexeren und insbesondere in biologischen Systemen zu untersuchen. Um sich ausgehend von den einfachen Verhältnissen in Lösungsmitteln denjenigen in lebenden Zellen anzunähern, die an sich zwar relativ einfache biologische Gebilde darstellen aber verglichen mit Lösungsmittelverhältnissen aufgrund der Vielzahl an mikroskopischen Umgebungen bereits sehr komplexe Systeme sind, werden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Lipidsuspensionen verwendet, da zum einen Lipiddoppelschichten das konstituierende Gerüst von Zellmembranen sind, zum anderen aber Suspensionen von Lipidtröpfchen verglichen mit Suspensionen von Liposomen relativ einfach hergestellt werden können. Als Photosensibilisator wurde sowohl für Lipid- als auch für Zellsuspensionen der lipophile Photosensibilisator Photofrin[®] verwendet.

3.2.1 Photofrin

Photofrin[®] (Photofrin) ist ein für die klinische PDT von Tumoren der Speiseröhre, der Blase sowie der Lunge zugelassenes Medikament [DGH98]. Dabei handelt es sich um ein Oligomeregemisch aus bis zu acht Porphyrinringen, die über Esther- und vor allem Etherbrücken miteinander verbunden sind [STT99]. Diese sog. Porphyrine wiederum sind zyklische Tetra-Pyrrole, bei denen die Pyrrolringe über Methinbrücken verbunden sind. Die so gebildeten Ringmoleküle sind aromatisch und sehr stabil. Porphyrine unterscheiden sich lediglich durch ihre verschiedenen Seitenketten. Der Gehalt an monomeren Porphyrinen wie z. B. Hämatoporphyrin und Protoporphyrin kann bei Photofrin bis zu 30 % betragen [QQG89]. Desweiteren beträgt die durchschnittliche Oligomeregröße $2,7 \pm 0,1$ Porphyrineinheiten [STT99]. Abbildung 3.14 zeigt die Strukturformel von Photofrin [S98].

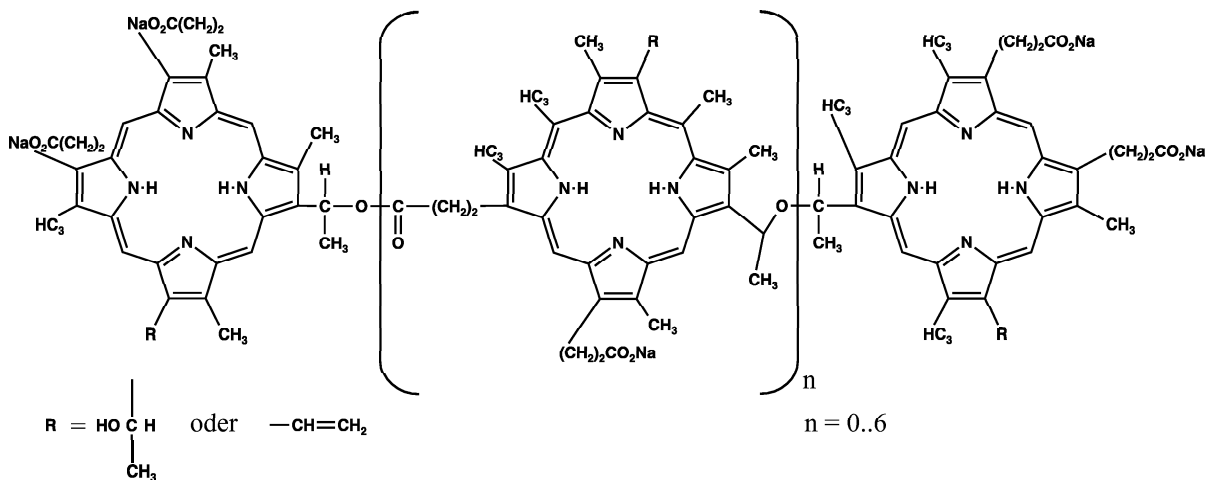


Abbildung 3.14: Strukturformel von Photofrin [S98]

Für Photofrin wurde nachgewiesen, daß es bei der PDT durch die Produktion von Singulett-Sauerstoff wirksam ist und nicht durch die Erzeugung von Radikalen [K84, PT86]. Somit ist Photofrin ein Typ II-Photosensibilisator.

Die Fluoreszenzlebensdauer von Hämatoporphyrin und von Hämatoporphyrin-Derivat beträgt etwa 4 - 5 ns für die dimeren und etwa 13 - 15 ns für die monomeren Anteile [ADL82, ACD83]. Nimmt man deshalb eine Größenordnung von 10 ns für die Fluoreszenzlebensdauer von Photofrin an, so ergibt sich unter Benutzung eines Absorptionsquerschnittes in derselben Größenordnung wie der des PPIX-DME eine Sättigungsintensität von etwa $10^6 \frac{\text{W}}{\text{cm}^2}$. Somit kann auch bei Photofrin näherungsweise der Übergang von Gleichung (2.12) zu (2.14) und von Gleichung (2.13) zu (2.15) auf Seite 27 vollzogen werden.

Da es sich bei Photofrin um ein Oligomerengemisch verschiedener Porphyrine handelt und somit keine Teilchenzahldichten berechnet werden können, zeigt abschließend Abbildung 3.15 den Absorptionskoeffizienten von 2 μM Photofrin in H_2O (durchgezogen) und D_2O (gestrichelt). Zu erkennen ist eine ausgeprägte UV-Bande sowie daß die Absorption im sichtbaren Spektralbereich in H_2O stärker ist als in D_2O .

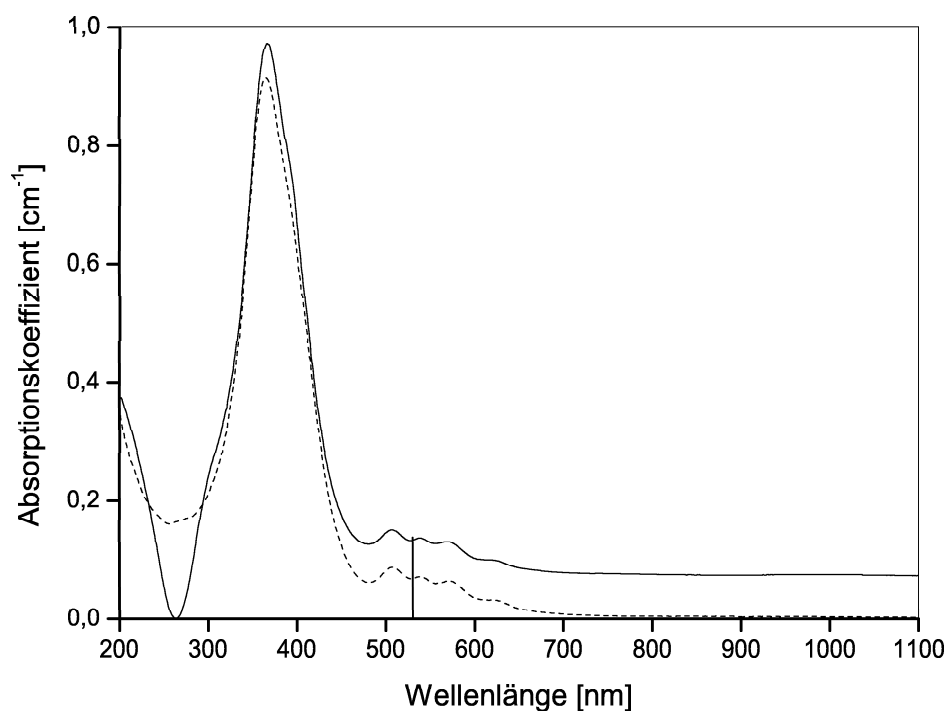


Abbildung 3.15: Absorptionskoeffizient von 2 μM Photofrin in H_2O (durchgezogen) und D_2O (gestrichelt) in Abhängigkeit der Wellenlänge; zusätzlich eingezeichnet die verwendete Anregungswellenlänge bei 532 nm

3.2.2 Lipidsuspensionen

Zur Präparation der Lipidsuspensionen wurde das Lipid Phosphatidylcholin (Reinheit 99 %, Sigma, Strukturformel siehe Abbildung 3.16) verwendet, da dieses ein Hauptbestandteil von zellulären Membranen ist [HLM82]. Das Phosphatidylcholinmolekül besteht aus der polaren Cholin-Kopfgruppe und zwei unpolaren, aliphatischen Ketten. Die Länge der aliphatischen Ketten variiert zwischen zwölf und 22. Deshalb kann für das Phosphatidylcholin auch nur eine mittlere molare Masse angegeben werden, die $\bar{m}_M = 768 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$ beträgt [K01].

Phosphatidylcholin ist in Wasser unlöslich und bildet dort eine Suspension von Liposomen und Vesikeln [HLM82] mit Größen von wenigen nm bis hin zu einigen μm [LRD83]. Zur Herstellung von Lipidsuspensionen wurde zunächst das pulverförmige Phosphatidylcholin mit Hilfe einer Analysenwaage abgewogen und unter Verwendung eines Mikropipettiers die einer Konzentration von $15 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ entsprechende Menge H_2O (bidestilliert) oder D_2O (Carl Roth) zugegeben. Um die Bildung einer Suspension zu erreichen, wurde das Gemisch aus Phosphatidylcholin und H_2O bzw. D_2O für 60 Minuten in ein Wärmebad bei einer Temperatur von 37°C gestellt. Anschließend erfolgte die Zugabe des Photosensibilisators Photofrin (Sanofi, New York, USA). Die Standardkonzentration betrug $1000 \mu\text{g}$ pro ml Lipidsuspension, geringere Photofrin-Konzentrationen wurden durch Verdünnung mit reiner Lipidsuspension erreicht.

Zur Bestrahlung wurden die Lipidsuspensionen in eine Durchfluß-Küvette (Hellma) gefüllt. Die Anregung des Photofrins erfolgte etwa 30 bis 60 Minuten nach dessen Zugabe zu den Lipidsuspensionen unter Verwendung des in Kapitel 3.1.2 beschriebenen Nd:YAG-Lasers. Die Pulsenergie zur optischen Anregung von Photofrin in Lipidsuspensionen betrug $120 \mu\text{J}$ bei einer Laserwellenlänge von 532 nm .

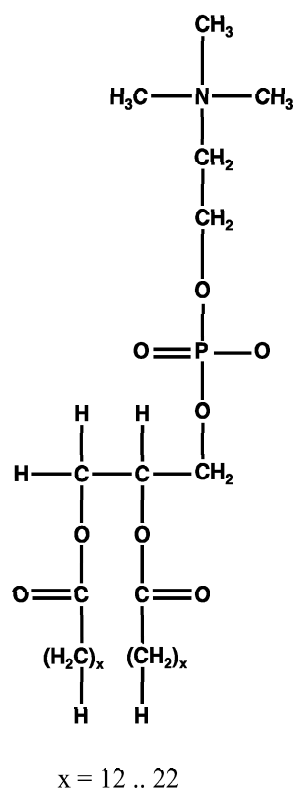


Abbildung 3.16:
Strukturformel des
Lipids Phosphatidyl-
cholin, $x = 12 \dots 22$
[HLM82]

3.2.3 Zellsuspensionen

Zur Herstellung von Zellsuspensionen wurden immortalisierte Kolonkarzinom³-Zellen (HT29) verwendet, da zum einen Kolonkarzinome unter Verwendung von Photofrin als Photosensibilisator mit Hilfe der PDT behandelt werden. Zum anderen weisen HT29-Zellen verglichen mit anderen Zellstämmen eine relativ niedrige Protein-Konzentration und damit eine relativ hohe Lipid-Konzentration in der Plasmamembran auf. Dies dürfte sich aufgrund der hohen Quenchingratenkonstante von Proteinen ($k_{\Delta Q} = 1,1 \cdot 10^4 \frac{1}{\text{gs}}$ [BK92]) verglichen mit der von Lipiden ($k_{\Delta Q} = 1,5 \cdot 10^2 \frac{1}{\text{gs}}$ [BK92]) nach Gleichung (2.9) auf Seite 25 sowie Gleichungen (2.15), (2.17), (2.19) und (2.23) auf den Seiten 27-29 positiv auf die zu erwartende Lumineszenzintensität auswirken. Die Einzelheiten der Präparation der Zellsuspensionen werden in Anhang A (Seite 144) beschrieben. Zur Bestrahlung wurden die Zellsuspensionen in eine Durchfluß-Küvette (Hellma) gefüllt. Die Anregung des Photofrins erfolgte etwa ein bis zwei Stunden nach dem Ablösen der Zellen vom Kulturflaschenboden unter Verwendung des in Kapitel 3.1.2 beschriebenen Nd:YAG-Lasers. Die Pulsenergie zur optischen Anregung von Photofrin in Zellsuspensionen betrug 390 μJ bei einer Laserwellenlänge von 532 nm.

3.3 Quenchersubstanzen

Zur Verifikation der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz wurden neben der Wellenlänge zusätzlich die beiden Singulett-Sauerstoff-Quencher Natriumazid (NaN_3 , $m_M = 65,01 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$, Reinheit > 99 %, Sigma) und Histidin ($m_M = 155,16 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$, Reinheit 99 %, Sigma) verwendet. Die chemische Struktur dieser beiden Quencher zeigt Abbildung 3.17:

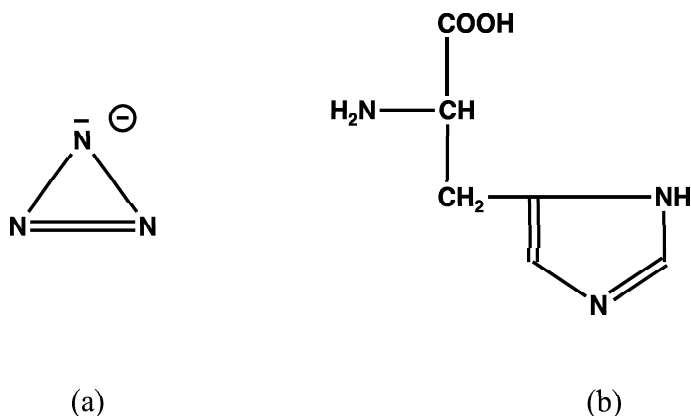


Abbildung 3.17: Strukturformel des Azidanions (a) und von Histidin (b)

³bösartiger Tumor des Dickdarms [P94]

In protischen Lösungsmitteln stellt das Azidanion N_3^- einen physikalischen Quencher für Singulett-Sauerstoff dar [B76]. Wegen seiner Effizienz, d.h. seiner großen Quenchingratenkonstante wird es oft als Werkzeug zum Nachweis von $^1\Delta_g$ -Sauerstoff verwendet (siehe z.B. [MWS97]). Hierbei ist jedoch zu beachten, daß es zusätzlich die Singulett- und Triplettzustände von Photosensibilisatoren zu quenchen vermag [B76]. Verwendung findet das Azidanion wegen der großen Löslichkeit in der Form des Natriumazids NaN_3 , wobei bei der Verwendung dessen hohe Giftigkeit zu beachten ist.

Histidin ist im Gegensatz dazu eine der zwanzig wichtigsten Aminosäuren, auf denen die Proteine aller Organismen basieren [V90] und deshalb in biologischen Systemen, insbesondere in Zellen, stets präsent. Nach [B76] stellt Histidin (ebenso wie die anderen Aminosäuren und Proteine) in Bezug auf Singulett-Sauerstoff sowohl einen physikalischen als auch einen chemischen Quencher mit bekanntem Reaktionsmechanismus dar, jedoch ist die Quenchingratenkonstante für den rein physikalischen Vorgang deutlich höher, nämlich $k_{\Delta Q} = 4,4 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$ bis $k_{\Delta Q} = 17 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$ (je nach Lösungsmittel und Meßmethode) gegenüber $k_R = 7 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$ für den reaktiven Prozeß (in $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{OH} = 1:1$) [NMK72]. Histidin wurde ebenfalls als Quencher für den Triplettzustand einiger Photosensibilisatoren identifiziert [NMK72], jedoch ist die entsprechende Rate mit $k_{\text{TQ}} = 1 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$ in $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{OH} = 1:1$ bzw. $k_{\text{TQ}} = 2 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$ in reinem H_2O etwa um den Faktor 50 geringer als für Singulett-Sauerstoff.

3.3.1 Verwendung von Quenchern in homogenen Lösungen

Zur Herstellung einer homogenen Lösung mit definierter Photosensibilisator-Konzentration und Zusatz einer der beiden Quenchersubstanzen wurde die jeweils zu verwendende Quenchersubstanz mit einer Analysenwaage abgewogen und unter Einsatz eines Mikropipettierers das Volumen an Photosensibilisatorlösung dazugegeben, um 10 mM Quencher-Konzentration in der jeweiligen Photosensibilisatorlösung definierter Konzentration zu erhalten. Geringere Quencher-Konzentrationen wurden über eine Verdünnungsreihe unter Verwendung von Photosensibilisatorlösung ohne Quencher erreicht. Anschließend wurden die so erhaltenen Lösungen bestrahlt (siehe auch Kapitel 3.1).

3.3.2 Verwendung von Quenchern in Lipidsuspensionen

Für die Lipidsuspensionen wurde eine Standardkonzentration von $15 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ Phosphatidylcholin in H_2O oder D_2O gewählt. Für die Präparation einer Lipidsuspension mit Quencher wurde zunächst eine Suspension mit der doppelten Standardkonzentration an Phosphatidylcholin ($30 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$) und der doppelten der gewünschten Photofrin-Konzentration in H_2O oder D_2O angesetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe einer Lösung mit der doppelten der gewünschten Quencher-Konzentration im gleichen Lösungsmittel im Verhältnis 1:1. Durch dieses Mischungsverhältnis wurde eine Suspension mit der Standardkonzentration an Phosphatidylcholin und der gewünschten Photofrin-

sowie Quencher-Konzentration erhalten. Somit konnten geringere Quencher-Konzentrationen nicht wie bei homogenen Lösungen durch eine Verdünnungsreihe erzeugt werden, sondern der oben beschriebene Mischvorgang mußte für jede gewünschte Quencher-Konzentration eigens durchgeführt werden. Die Zeitdauer zwischen dem Mischen der Lipidsuspension mit der Quencherlösung und der anschließenden Messung der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz betrug standardmäßig eine Minute.

3.3.3 Verwendung von Quenchern in Zellsuspensionen

Suspensionen von $7,5 \cdot 10^6$ inkubierten HT29 pro Milliliter phosphatgepufferter, physiologischer Salzlösung (H_2O -PBS bzw. D_2O -PBS) und einer definierten Quencher-Konzentration wurden analog zu den Lipidsuspensionen durch Verwendung einer Suspension mit der doppelten Konzentration an inkubierten HT29 und der Zugabe einer Lösung mit der doppelten der gewünschten Quencher-Konzentration in H_2O -PBS bzw. in D_2O -PBS im Verhältnis 1:1 hergestellt. Die Zeitdauer zwischen dem Mischen der Zellsuspension mit der Quencherlösung und der anschließenden Messung der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz betrug eine Minute.

3.4 Herstellung und Bestimmung der Sauerstoff-Konzentration in homogenen Lösungen

Die wie in Kapitel 3.1 beschrieben hergestellten Lösungen sind als luftgesättigt zu betrachten und besitzen deshalb, je nach Löslichkeit von Sauerstoff im jeweiligen Lösungsmittel, eine bestimmte Sauerstoff-Konzentration. Die allgemeine Beschreibung der Löslichkeit von Gasen in Flüssigkeiten erfolgt durch das Henrysche Gesetz, welches in Anhang B (Seite 145) dargestellt ist.

3.4.1 Herstellung eines bestimmten Sauerstoffgehalts

Befindet sich eine Lösung in Bezug auf die darin gelösten Gase im Gleichgewichtszustand mit der Atmosphäre, so wird diese als „luftgesättigt“ bezeichnet. Um in einer Lösung eine Sauerstoff-Konzentration zu erhalten, die verglichen mit der bei Luftsaturation vorherrschenden Sauerstoff-Konzentration in Lösung erniedrigt ist, wurde diese mit gasförmigem Stickstoff N_2 5.0 (Linde, Höllriegelskreuth) solange gewaschen, bis sich die gewünschte Sauerstoff-Konzentration eingestellt hat. Zur Erzielung einer erhöhten Sauerstoffkonzentration wurde die Lösung entsprechend mit gasförmigem Sauerstoff (Linde) gewaschen. Bei länger andauernden Messungen der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz wurde die Lösung während laufender Messung blasenweise mit Stickstoff oder Sauerstoff nachgewaschen.

3.4.2 Polarographische Messung des Sauerstoffpartialdampfdrucks

Bei der Verwendung des Photosensibilisators 8-MOP in D₂O als Lösungsmittel wurde die Konzentration des gelösten Sauerstoffs über dessen Partialdampfdruck π_{H} bestimmt. Die Messung des Partialdampfdrucks erfolgte über die polarographische Messung des Sauerstoffpartialdampfdrucks ($p\text{O}_2$) unter Benutzung des LICOX $p\text{O}_2$ Meßkanals (GMS mbH, Kiel), einer Mikro-Katheter- $p\text{O}_2$ -Meßsonde und eines Ni/NiCr-Thermoelementes (GMS). Eine genauere Beschreibung der O₂-Polarographie befindet sich in Anhang C.1 (Seite 148).

Sowohl Temperatur- als auch $p\text{O}_2$ -Sonde werden nach dem Einfüllen der Lösung in der Durchflußküvette (Hellma) positioniert. Dabei ist darauf zu achten, daß die komplette $p\text{O}_2$ -sensitive Zone des $p\text{O}_2$ -Sensors in die Lösung getaucht ist, d. h. daß sich der Sensor bis mindestens 14 mm proximal der Katheterspitze in der Lösung befindet. Beide Sensoren verbleiben für die gesamte Dauer einer Einzelmessung in der Küvette. Ihre Daten werden mit Hilfe eines an den LICOX $p\text{O}_2$ Meßkanal angeschlossenen PCs gespeichert. Die Speicherung erfolgt alle 10 Sekunden. Man erhält somit für die Dauer der Messung einen Verlauf der Temperatur und des Sauerstoffpartialdampfdrucks, deren Mittelwerte für die Berechnung der Sauerstoff-Konzentration mit Hilfe des Henry-Gesetzes verwendet werden. Dazu werden die Gleichungen (B.1), (B.3) und (B.4) (Anhang B) benutzt, wobei in Ermangelung einer Henry-Konstante für die Löslichkeit von Sauerstoff in D₂O diejenige für die Löslichkeit von Sauerstoff in H₂O verwendet wird. Mit $k_{\text{H}}(T_0) = 1,3 \cdot 10^{-3} \frac{\text{M}}{\text{atm}}$ und Umrechnung in die passende Einheit $\frac{\text{M}}{\text{Torr}}$ sowie mit $\frac{d[\ln(\frac{k_{\text{H}}(T)}{k_{\text{H}}(T_0)})]}{d(\frac{1}{T})} = 1500 \text{ K}$ erhält man die dem jeweiligen mittleren Partialdampfdruck entsprechende mittlere Sauerstoff-Konzentration in Wasser. Dieses Verfahren zur Bestimmung der Sauerstoff-Konzentration wurde ausschließlich bei Lösungen von 8-MOP in D₂O verwendet.

3.4.3 Faseroptische Messung des Sauerstoffgehalts

Bei allen anderen Photosensibilisatoren in homogenen Lösungen wurde der Sauerstoffgehalt in Lösung unter Verwendung eines faseroptischen Sauerstoffmeßgerätes (Microx TX VP 1.0, PreSens GmbH, Regensburg) bestimmt. Die Steuerung und Meßdatenauswertung erfolgte mittels mitgelieferter Software und PC. Das Meßprinzip ist in Anhang C.2 (Seite 149) erläutert.

Vor jeder Messung muß der Sensor einer 2-Punkt-Kalibrierung unterzogen werden. Dazu werden zwei Kalibrierwerte, nämlich Sauerstoff-freies Wasser (Kalibrierstandard 0) und eine luftgesättigte Lösung (Kalibrierstandard 100) verwendet. Dem Wasser wird laut Hersteller durch eine chemische Reaktion mit Natriumdithionit sehr effektiv Sauerstoff entzogen. Als Kalibrierstandard 100 muß das Lösungsmittel verwendet werden,

in welchem die Messung ablaufen soll. Um im Falle von EtOD als Lösungsmittel die 100 %-Luftsättigung zu erhalten, wird durch dieses für 10 min ethanolhaltige Luft gepumpt. Zur Kontrolle der Kalibrierung wird anschließend der Sauerstoffgehalt in den beiden Kalibrierlösungen gemessen, wobei sich jedesmal Abweichungen von bis zu 0,2 %-LS ergaben. Laut Hersteller liegt die maximale Auflösung in dem in dieser Arbeit nötigen Messbereich bei 0,07 %-LS. Addiert man noch die Schwankung während der Messung von 0,1 %-LS hinzu, erhält man eine Messungenauigkeit von etwa $\pm 0,4$ %-LS. Die Umrechnung des Sauerstoffgehalts (%-LS) in die jeweilige Sauerstoffkonzentration (μM) erfolgte unter Benutzung des Bunsen-Gesetzes auf dessen ausführliche Beschreibung verzichtet wird. Nach diesem läßt sich die Konzentration in μM an gelöstem Sauerstoff in einem Lösungsmittel wie folgt aus dem jeweiligen Sauerstoffgehalt (in Prozent derjenigen Sauerstoff-Konzentration einer luftgesättigten Lösung) [P01b] berechnen:

$$[\text{O}_2][\mu\text{M}] = \left(\frac{p_{\text{atm}} - p_{\text{LM}}}{p_{\text{norm}}} \cdot \frac{\% \text{LS}}{100} \cdot 0,2095 \cdot \alpha(T) \cdot 1000 \cdot \frac{m_{\text{M}}(\text{O}_2)}{V_{\text{M}}(\text{O}_2)} \right) \cdot 31,25 \quad (3.2)$$

Hierbei ist p_{norm} der Normaldruck von 1013,25 hPa, p_{atm} der aktuelle atmosphärische Luftdruck, p_{LM} der Dampfdruck des Lösungsmittels bei der aktuellen Temperatur, %LS der Sauerstoffgehalt der Lösung in Prozent der Luftsättigung, $\alpha(T)$ der Bunsen-Koeffizient des Lösungsmittels bei der aktuellen Temperatur, $m_{\text{M}}(\text{O}_2)$ die Molmasse und $V_{\text{M}}(\text{O}_2)$ das Molvolumen von Sauerstoff.

3.5 Kolokalisationsaufnahmen

Da die Diffusionsreichweite von Singulett-Sauerstoff innerhalb von Zellmembranen lediglich wenige Nanometer beträgt [BK92], relaxiert Singulett-Sauerstoff im wesentlichen dort innerhalb der Zelle, wo der Photosensibilisator lokalisiert ist. Zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation von Photofrin in HT29-Zellen wurden Kolokalisationsaufnahmen der Fluoreszenz von Photofrin und zweier weiterer sogenannter Organellfarbstoffe unter Verwendung eines Fluoreszenzmikroskops gemacht. Dazu wurden die Zellen in Kulturschalen unter Standardkulturbedingungen (siehe Kapitel 3.2.3) auf Mikroskop-Objektträgern gezüchtet.

3.5.1 Aufbau einer Zelle

Im folgenden seien die wesentlichen Bestandteile einer Zelle kurz erläutert. Der schematische Aufbau samt der Lokalisation der verwendeten Organellfarbstoffe ist in Abbildung 3.18 auf Seite 59 gezeigt.

Das Innere einer Zelle wird von der Umgebung durch deren **Plasmamembran** abgegrenzt. Sie ist eine in sich geschlossene, jedoch selektiv durchlässige äußere Begrenzung. Die Plasmamembran besteht, ebenso wie die Membranhüllen einiger Zellorganellen, aus einer Lipiddoppelschicht, wobei die hydrophoben Enden der Lipide zueinander gewandt sind. In diese mehr oder weniger flüssige Doppelschicht sind Proteine ein- und angelagert, die unterschiedlich weit in sie hinein- oder sogar durch sie hindurch reichen. Sehr kleine Moleküle wie das des Wassers oder die von gelösten Gasen können sehr leicht durch Kinken hoher Beweglichkeit in der Doppelschicht ins Zellinnere dringen. Makromoleküle können in doppelschicht-begrenzten Bläschen in das Zellinnere transportiert werden. Zu den Funktionen der Plasmamembran gehören also neben der Abgrenzung des Zellinneren auch der zelluläre Stoffwechsel.

Der häufig kugelförmige **Zellkern** ist das größte Zellorganell. Die Kernhülle ist ein flacher, membranumgrenzter Hohlraum, der von Kernporen durchsetzt ist. Durch diese Poren können Makromoleküle zwischen dem Zytoplasma der Zelle und dem Karyoplasma des Kerns, welches Proteine und die Nukleinsäuren RNA und DNA enthält, ausgetauscht werden.

In den **Ribosomen**, etwa 25 nm großen, kugelförmigen Zellorganellen, vollzieht sich die Proteinsynthese. Sie liegen frei im **Zytoplasma** der Zelle oder am endoplasmatischen Retikulum.

Das **endoplasmatische Retikulum (ER)** ist ein flaches, röhren- und bläschenförmiges Membransystem. In den vom ER abgespaltenen Bläschen (Vesikel) können Stoffe gespeichert oder transportiert werden.

Der **Golgi-Apparat** besteht aus Stapeln von untereinander verbundenen, membranumgrenzten Hohlräumen, den Membranzisternen. Er dient hauptsächlich Sekretionsvorgängen, in deren Verlauf Stoffe mit einer Membran umgeben, als Golgi-Vesikel zur Plasmamembran transportiert und ins Zelläußere abgegeben werden.

Lysosomen sind enzymhaltige Vesikel, die meist dem ER oder dem Golgi-Apparat entstammen (primäre Lysosomen) und dem Proteintransport sowie dem Abbau von aufgenommenen Stoffen dienen (sekundäre Lysosomen). Desweiteren gibt es sogenannte Autolysosomen, die zelleigenes Material und ganze Zellorganellen abbauen, was zur ständigen Erneuerung der Organellen und der Beseitigung überflüssiger Strukturen beiträgt.

Die **Mitochondrien** sind von einer glatten Membran umgeben, der eine innere Membran folgt, die zur Oberflächenvergrößerung tief gefaltet ist. Mitochondrien dienen u. a. der Energiegewinnung der Zelle durch die Kohlenhydrat- und Lipidoxidation zu CO_2 und H_2O unter O_2 -Verbrauch. Die so gewonnene Energie wird in Form von Adenosin-triphosphat (ATP) gespeichert und steht für Stoffwechselvorgänge zur Verfügung.

3.5.2 Verwendete Organellfarbstoffe

Für die Inkubation der HT29-Zellen mit Organellfarbstoffen wurde eine Lösung des jeweiligen Farbstoffs in bestimmter Konzentration in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) hergestellt und für die jeweilige Inkubationsdauer auf den Zellen belassen. Da sowohl für die verwendeten Organellfarbstoffe wie auch für den Photosensibilisator Photofrin verschiedene Inkubationszeiten verwendet wurden, mußte der Startpunkt der Inkubation so gewählt werden, daß die Inkubationszeiten zum gleichen Zeitpunkt endeten. Nach Ablauf der Inkubationszeiten wurde der Überstand aus DMEM abgesaugt und die Zellen mehrmals mit PBS gewaschen. Zum Einfärben des **Zellkerns** wurde Hoechst 33342 (Molecular Probes, Eugene, USA) verwendet. Bei ihm handelt es sich um einen dazu weit verbreiteten Farbstoff. Er dringt sehr leicht in lebende Zellen ein und fluoresziert blau nach Bindung an die DNA. Die Inkubationszeit betrug 10 Minuten mit einer Inkubationskonzentration von $2 \mu\text{M}$. Die **Mitochondrien** wurden mit Rhodamin 6G (Sigma) eingefärbt, welches sehr schnell in Zellen eindringt, sich in den Mitochondrien akkumuliert und dort mit Cardiolipin ein unlösliches Salz bildet. Die Inkubationszeit mit Rhodamin 6G betrug fünf Minuten mit einer Inkubationskonzentration von $50 \frac{\mu\text{g}}{\text{l}}$. Abbildung 3.18 zeigt den schematischen Aufbau einer tierischen (und damit auch menschlichen) Zelle. Die Lokalisation des Farbstoffes Hoechst 33342 im Zellkern sowie die von Rhodamin 6G in den Mitochondrien sind blau und grün hervorgehoben.

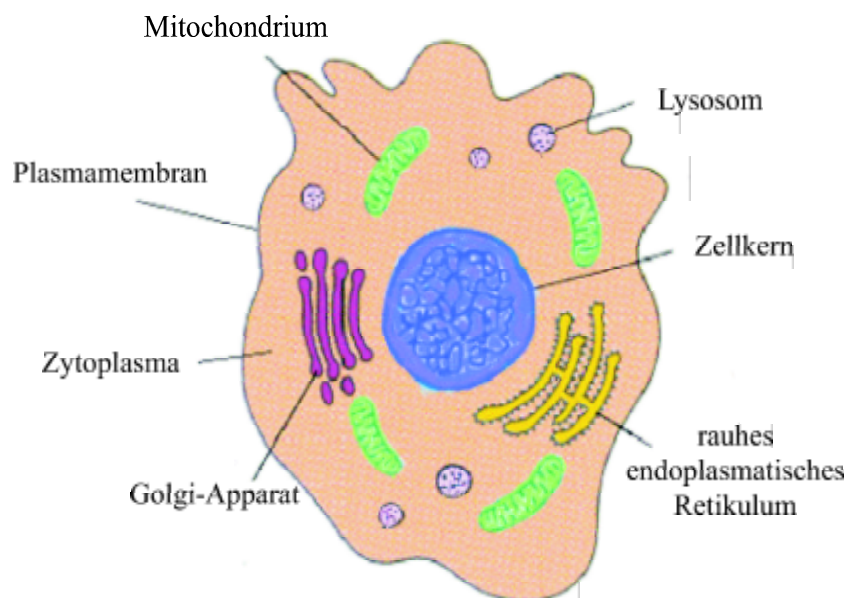


Abbildung 3.18: Schematischer Aufbau einer tierischen Zelle nach [B98]; Lokalisation von Hoechst 33342 (blau) im Zellkern und von Rhodamin 6G (grün) in den Mitochondrien

3.5.3 Fluoreszenzmikroskopie

Als Fluoreszenzmikroskop wurde ein Zeiss Axiotech Mikroskop (Zeiss, Jena) verwendet. In Abbildung 3.19 auf Seite 61 ist der Strahlengang schematisch dargestellt. Als Lichtquellen standen für die Fluoreszenzaufnahmen eine Quecksilberdampfhochdrucklampe (HBO) und für die Durchlichtaufnahmen eine Halogenlampe zur Verfügung. Im Strahlengang der HBO-Lampe befand sich ein Neutralglasfilter (NG-4). Mit Hilfe der Blende ist es möglich, den ausgeleuchteten Bildausschnitt zu verkleinern. Die Blende war jedoch bei allen Aufnahmen ganz geöffnet. In den folgenden Filterblock waren die zu den Organellfarbstoffen und zu Photofrin passenden Anregungs- und Emissionsfilter eingebaut. Der Anregungsfilter besitzt seine höchste Transmission im Absorptionsbereich des Farbstoffs und ist sonst nicht transmittierend. Der dichroide Strahlteilerspiegel reflektiert das gefilterte Anregungslicht auf die Probe. Das von dort ausgehende Fluoreszenzlicht wird vom Strahlteilerspiegel nicht reflektiert und durch den Emissionsfilter von Resten des Anregungslichts und allen anderen, nicht zur Fluoreszenz des jeweiligen Farbstoffes gehörigen Lichtquellen, spektral getrennt. Die so entstandenen Fluoreszenzbilder jedes Farbstoffes wurden von einer CCD-Kamera (PCO, Kelheim) aufgenommen und per Bildverarbeitung zusammengefügt.

Tabelle 3.1 gibt eine Liste der verwendeten Anregungs- und Emissionsfilter (Omega Optical, Brattleboro, USA) sowie der dichroiden Spiegel (Omega Optical) wieder. Die jeweilige Filterbezeichnung enthält die Zentralwellenlänge sowie die Halbwertsbreite (z. B. hat der Filter 695AF55 eine Zentralwellenlänge von 695 nm und eine Halbwertsbreite von 55 nm). Die Bezeichnung in Klammern ist die Katalogbezeichnung des deutschen Vertriebs durch die Firma Photomed GmbH, Seefeld.

Farbstoff	Anregungsfilter	dichroider Spiegel	Emissionsfilter
Photofrin	405DF40 (XFF1008)	415DRLP (XF2059)	695AF55 (XF3076)
Hoechst 33342	365WB50 (XF1005)	400DCLP (XF2001)	450AF58 (XF3073)
Rhodamin 6G	475AF40 (XF1073)	505DRLP (XF2010)	545AF35 (XF3074)

Tabelle 3.1: Liste der für die Kolokalisationsaufnahmen verwendeten Anregungs- und Emissionsfilter sowie der dichroiden Spiegel; Erklärung der Bezeichnungen siehe Text

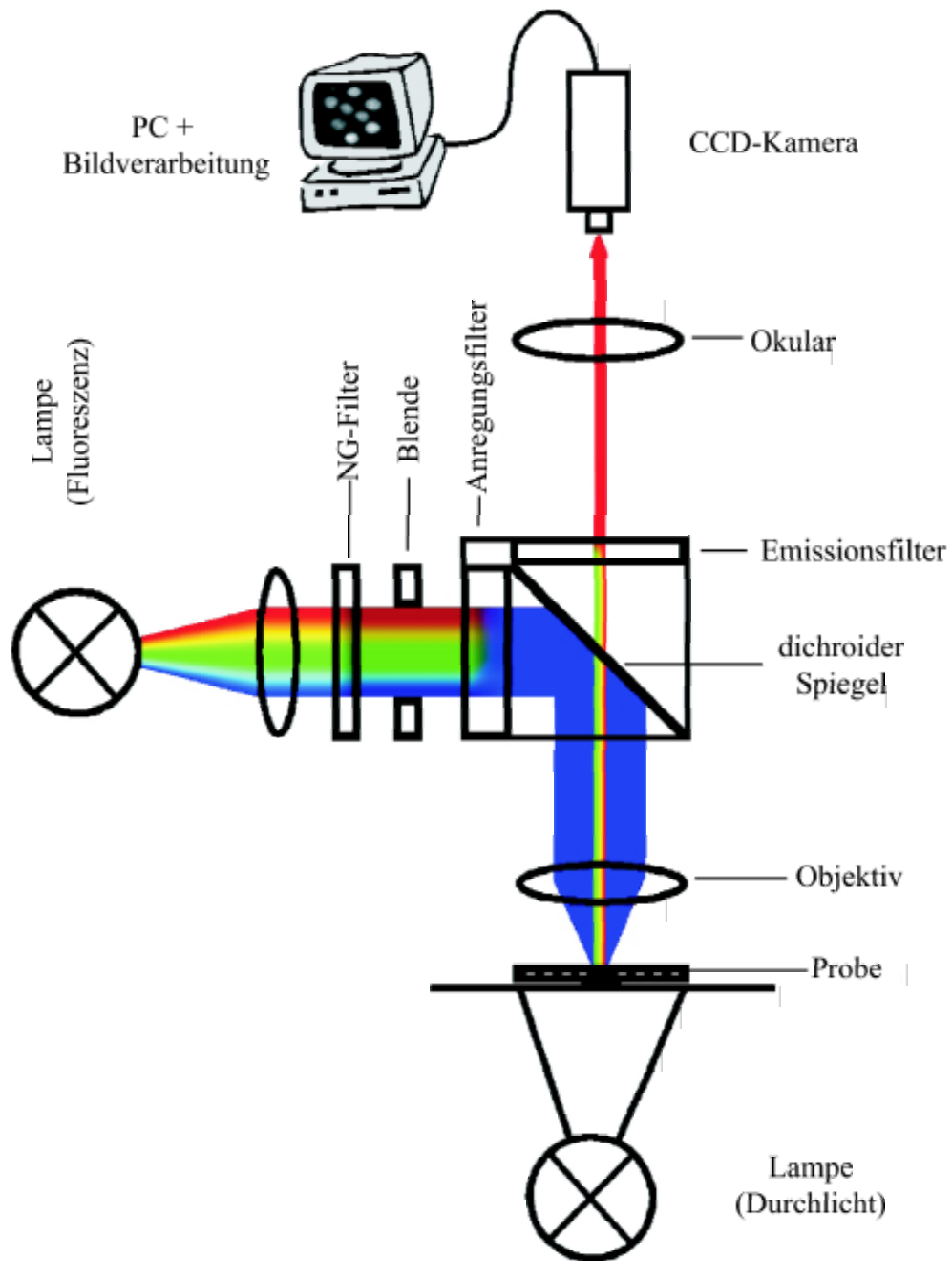


Abbildung 3.19: Schematische Darstellung des Strahlengangs im Fluoreszenzmikroskop [H01]

3.5.4 Generierung von Falschfarbenbildern und Fluoreszenzintensitätsprofilen

Für die Aufnahme von Durchlichtbildern wurde bei der CCD-Kamera eine Integrationszeit von 200 ms gewählt, für die Aufnahme von Fluoreszenzbildern bei Photofrin und bei Rhodamin 6G eine Sekunde, bei Hoechst 33342 zwei Sekunden. Den von der CCD-Kamera aufgenommenen Graustufenbildern im 8 bit TIFF-Format wurde die Farbe Blau im Falle des Farbstoffs Hoechst 33342, die Farbe Grün im Falle von Rhodamin 6G und die Farbe Rot bei Photofrin zugeordnet. Die zu den einzelnen Lokalisationen gehörige Falschfarbendarstellung im 24 bit RGB-Format wurde durch Überlagerung der drei Falschfarbenbilder im 8 bit TIFF-Format gebildet.

Zur genaueren Bestimmung der subzellulären Lokalisation von Photofrin wurden Schnitte durch die jeweiligen Graustufenbilder verschiedener Zellen der gleichen Photofrin-Inkubation angefertigt. Dabei wurde zunächst das Helligkeitsprofil des korrespondierenden Graustufenbildes entlang der jeweiligen Schnittachse in ein Höhenprofil umgerechnet. Durch Normierung der Höhe des Höhenprofils und des Abstandes der entgegengesetzt liegenden Schnittpunkte zwischen Profilachse und Plasmamembran für jede Profilachse konnte so über verschiedene Profile und verschiedene Zellen gemittelt werden.

3.6 Zellvitalitätsmessung

Da sowohl das Photofrin selbst eine gewisse Dunkeltoxizität besitzt, wie auch die Produktion von Singulett-Sauerstoff mit der oxidativen Schädigung von zellulären Bestandteilen einhergeht, wurde im Anschluß an die Messung der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz die Zellvitalität, d. h. das Verhältnis von lebenden Zellen zur Gesamtzahl an Zellen in einer bestrahlten Suspension, bestimmt, um zu zeigen, daß die gemessene Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz von Singulett-Sauerstoff stammt, der in intakten Zellen generiert wurde und nicht in oder an suspendierten Zellbestandteilen.

Hierzu wurde die Trypan Blau-Färbung verwendet. Trypan Blau kann nicht durch die intakte Plasmamembran von lebenden Zellen hindurch ins Zellinnere gelangen. Jedoch verbraucht eine Zelle Energie, um diesen Farbstoff nicht ins Innere dringen zu lassen. Bei abgestorbenen Zellen hingegen kann deshalb Trypan Blau durchaus ins Zellinnere dringen, so daß sich tote Zellen blau anfärben lassen. Für die Durchführung der Trypan Blau-Färbung wurde der jeweiligen bestrahlten Zellsuspension mit noch unbestimmter Zellvitalität Trypan Blau im Verhältnis 2:1 zugegeben. Das Verhältnis von lebenden, d. h. nicht blau angefärbten Zellen zur Gesamtzahl an gezählten Zellen wurde unter Verwendung eines Lichtmikroskops und einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

3.7 Detektion der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz und Meßwerterfassung

Die von der Küvette ausgehende Lumineszenz des Singulett-Sauerstoffs mit einer Wellenlänge von $\lambda = 1,27 \mu\text{m}$ wird von einer als Kondensor fungierenden Plan-Konvex-Linse weitestgehend parallelisiert und von zwei Zylinderlinsen auf die $3 \times 8 \text{ mm}$ große aktive Fläche des Photomultipliers abgebildet, wobei es vorher noch durch einen dielektrischen Langpaßfilter mit einer Kante bei 1110 nm gefiltert wird (siehe Abbildung 3.20 auf Seite 64). Die spektrale Selektion des zu detektierenden Lumineszenzlichtes wird durch zwei Interferenzfilter mit einer Zentralwellenlänge von 1270 nm und Halbwertsbreiten von 25 nm (Schott, Mainz) und 13 nm (L.O.T. Oriel GmbH & Co. KG, Darmstadt) erreicht. Die Abstände der Linsen zueinander und zur Küvette wurden unter Verwendung einer digitalen Kamera, durch die der Photomultiplier zunächst ersetzt wurde, so gewählt, daß maximale Energie auf den CCD-Chip der Kamera trifft. Hierbei ist bei der Positionierung der Zylinderlinsen zusätzlich darauf zu achten, daß bei gegebenen Brennweiten der rechteckigen Form der aktiven Fläche des Photomultipliers Rechnung getragen wird. Außerdem befindet sich diese aktive Fläche im Photomultiplier ca. 15 cm hinter dem Eintrittsfenster. Da der Durchmesser des davor positionierten Interferenzfilters lediglich 25 mm beträgt, wurden entsprechend langbrennweitige Zylinderlinsen verwendet. Die Grobpositionierung der verwendeten Linsen erfolgte durch Schlitten auf einer optischen Bank, zur feinen Positionierung wurden Mikrometerschrauben verwendet. Die CCD-Kamera wurde dann gegen den Photomultiplier ausgetauscht, welcher so positioniert wurde, daß sich die aktive Fläche an der früheren Stelle des CCD-Chips befindet. Zur weiteren Störlichtunterdrückung wurde neben der Verwendung der Interferenzfilter die gesamte optische Anordnung samt Photomultiplier eingehaust.

Der zur Detektion der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz eingesetzte Photomultiplier (R5509-42, Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herrsching) besitzt eine InP/InGaAsP-Oberfläche, welche beim Einsatz zur Verminderung des Dunkelrauschens auf -80°C gekühlt wird. Nach zwei Stunden Wartezeit bei dieser Temperatur beträgt der Dunkelstrom weniger als 10 nA . Die Quanteneffizienz beträgt 1% bei 1300 nm und die Stromverstärkung $5 \cdot 10^5$ bei einer Kathoden-Anoden-Spannung von 1500 V . Wird ein Photon nachgewiesen, so besitzt das Ausgangssignal bei einer Impedanz von 50Ω eine Anstiegszeit von $2,40 \text{ ns}$, eine Abklingzeit von $6,36 \text{ ns}$ und eine Pulshöhe von $8,5 \text{ mV}$. Zur Kühlung wird der kalte Dampf von flüssigem Stickstoff verwendet, welcher in einer Kühlschlange um die in einer Kühlkammer befindliche Photomultiplier-Röhre durch Anlegen eines Überdrucks von 350 mbar aus einer Stickstoffgas-Flasche an die verwendete Stickstoffkanne gepumpt wird. Die Steuerung des Abkühlvorgangs sowie der Temperatur der Kühlschlange erfolgt durch eine Kontrolleinheit, welche bei Bedarf den Fluß des kalten Stickstoffdampfes durch Schließen eines Ventils unterbricht.

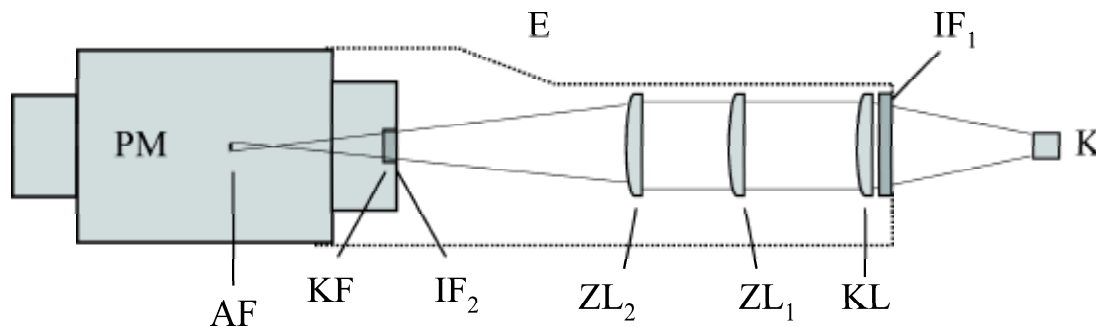


Abbildung 3.20: Schematische Darstellung der verwendeten optischen Anordnung zur Detektion der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz mit Strahlverlauf; K: Küvette, KL: Kondensorlinse, $ZL_{1,2}$: Zylinderlinsen, $IF_{1,2}$: Interferenzfilter, KF: dielektrischer Langpaßfilter, AF: aktive Fläche, PM: Photomultiplier, E: Einhausung

Zur Erfassung des zeitlichen Verlaufs der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz wird das Verfahren des Photonenzählens (single photon counting) verwendet. Dazu wird das vom Photomultiplier kommende elektrische Signal zunächst durch einen schnellen Vorverstärker (6954-B-50 Fast Pulse Preamplifier, Philips Scientific, Ramsey, USA) mit einer Anstiegszeit von 200 ps um einen Faktor 50 verstärkt, so daß die Schwelle des internen Diskriminators der Vielkanalzählkarte (7886S Dual Input Multiscaler/TOF/Photon Counter, FAST ComTec GmbH, Oberhaching) überschritten werden kann. Diese Zählkarte mißt den zeitlichen Abstand zwischen dem Triggersignal (Start) und dem Multipliersignal (Stop) in Zeitkanäle eingeteilt. Die minimale Kanalbreite, d. h. die maximale Zeitauflösung des Gerätes beträgt 1 ns. Die zu beobachtende Zeitspanne nach einem Laserpuls kann nach Kanalanzahl \times Kanalbreite über die Wahl dieser beiden Parameter eingestellt werden. Wird ein Photon eine bestimmte Zeit nach einem Laserpuls detektiert, so wird der Inhalt des dieser Zeitspanne entsprechenden Zählkanals um eins erhöht und auf das nächste Startsignal (den nächsten Laserpuls) gewartet. Dies wiederholt sich solange, bis die vorgegebene Zahl an Laserpulsen (Startsignalen) erreicht ist. Die zeitliche Verteilung der so gezählten Photonen wird schließlich zur Weiterverarbeitung in einer ASCII-Datei gespeichert.

Die Kanalbreite wurde im Falle des 8-MOP zu 16 ns gewählt, ebenso bei Lipidsuspensionen. Bei allen anderen Experimenten mit homogenen Lösungen betrug die Kanalbreite 4 ns. Aufgrund des sehr geringen Lumineszenzsignals wurde bei Zellsuspensionen eine Kanalbreite von 128 ns verwendet.

Ebenfalls aufgrund des geringen Lumineszenzsignals wurden im Falle des 8-MOP pro Experiment 10000 Laserpulse abgegeben, bei allen anderen Experimenten mit homoge-

nen Lösungen 40000 Laserpulse. Bei Lipidsuspensionen erfolgte die Meßwerterfassung über 20000 Pulse, bei Zellsuspensionen über 100000 Pulse.

Die Zählkarte wurde bei allen Experimenten mit Ausnahme des 8-MOP (s. u.) durch eine Photodiode getriggert, auf die die durch ein Glasplättchen ausgekoppelte Laserintensität gerichtet wurde (vergleiche Abbildungen 3.7 und 3.13). Durch einen zeitlichen Versatz in der Detektionselektronik können allerdings die ersten fünf Mikrosekunden nach dem Laserpuls nicht detektiert werden. Im Falle des 8-MOP wurde eine Erfassung des Meßsignals sofort ab dem Laserpuls durch ein Triggern sowohl des Lasers wie auch der Meßkarte durch einen externen Pulsgenerator möglich, wobei mittels eines Delaygenerators die Meßkarte einige Mikrosekunden vor dem verwendeten Laser getriggert wurde.

Kapitel 4

Ergebnisse und Diskussion

4.1 Lumineszenz von Singulett-Sauerstoff in homogenen Lösungen

Im folgenden werden nun die Meßergebnisse der Anstiegs- und Abklingraten der Lumineszenz von Singulett-Sauerstoff, generiert durch die jeweiligen Photosensibilisatoren in homogenen Lösungen, vorgestellt, soweit vorhanden mit Literaturdaten verglichen und diskutiert. Zur näheren Bestimmung der Rolle des Singulett-Sauerstoffs in der Gesamtheit der photochemischen Reaktionen bei der Photochemotherapie muß die Effizienz der Singulett-Sauerstoff-Produktion durch den jeweiligen Photosensibilisator bestimmt werden [TSM01]. Da aber die Sauerstoff-Konzentration in Gewebe *in vivo* wesentlich geringer sein kann als in luftgesättigten Suspensionen oder *in vitro* [VKO89], wird die Effizienz $P_{T_1}([O_2])$ (siehe Gleichung (2.28 auf Seite 31) der sauerstoff-induzierten Triplett- T_1 -Deaktivierung des jeweiligen Photosensibilisators in Abhängigkeit der Sauerstoff-Konzentration gezeigt. Diese ist nach Gleichung (2.25) auf Seite 31 zum einen proportional zur Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute Φ_Δ , zum anderen skaliert letztere mit der Sauerstoff-Konzentration genauso wie P_{T_1} .

Abbildung 4.1 auf Seite 68 zeigt zwei exemplarische Einzelmessungen der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz, generiert durch photoaktiviertes 8-MOP in D_2O (a) bzw. ATMPn in EtOD (b). Beide Lösungen waren luftgesättigt, so daß die Sauerstoff-Konzentration $210 \mu M$ (a) bzw. $1850 \mu M$ (b) betrug. Zu erkennen ist, daß durch das getrennte, zeitlich versetzte Triggern von Laser und Zählkarte bei a) der komplette zeitliche Verlauf der Lumineszenz beobachtet werden kann, anders als bei b). Desweiteren ist anhand der Fitkurve zu erkennen, daß im Falle des 8-MOP (a) das Natriumazid keinen Einfluß auf den Signalanstieg, d. h. die Relaxationsrate des Triplett- T_1 -Zustandes nimmt, wohingegen bei ATMPn (b) ein steilerer Signalanstieg zu beobachten ist und somit die Relaxationsrate des Triplett- T_1 -Zustandes durch Natriumazid durchaus ver-

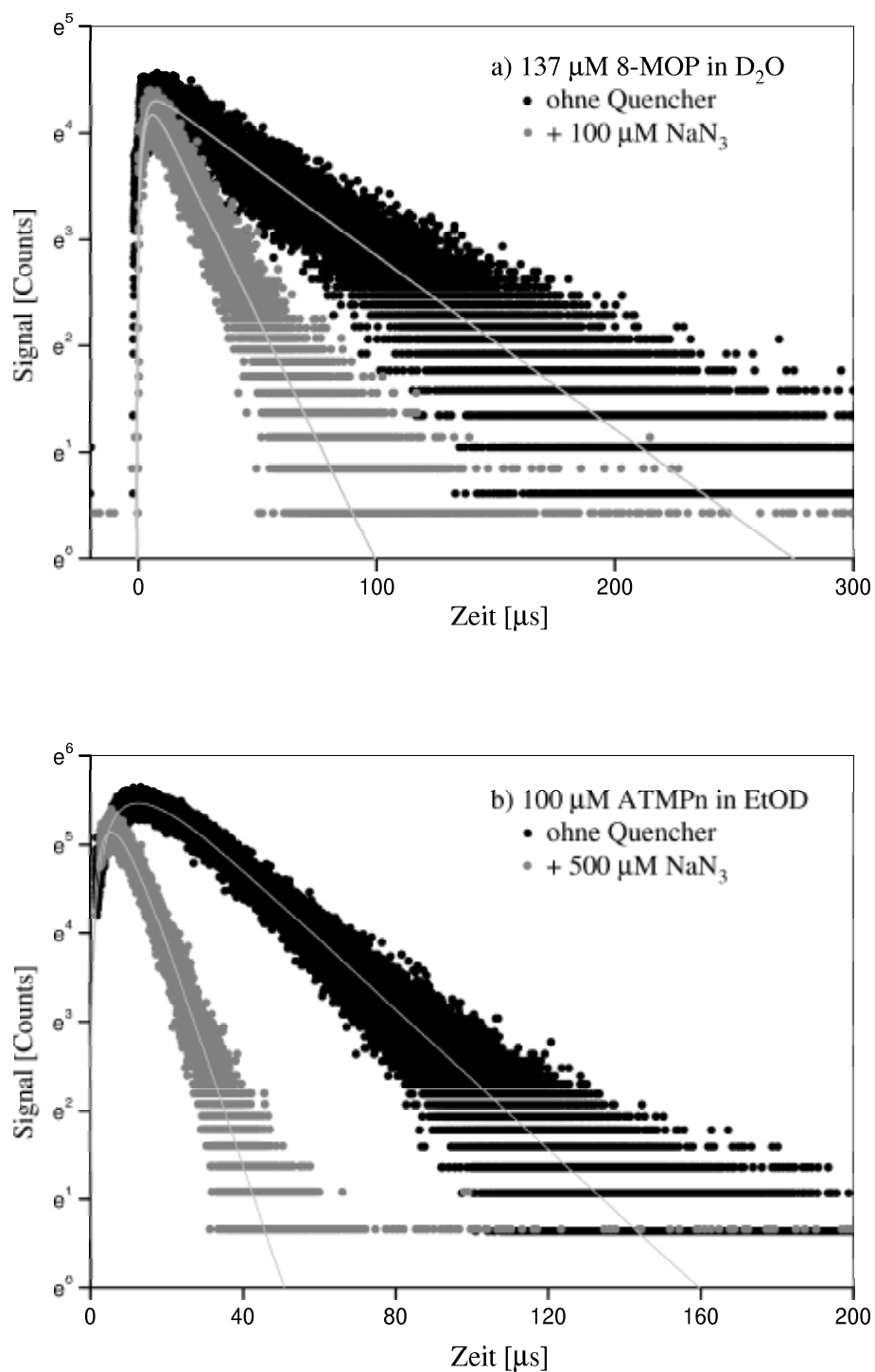


Abbildung 4.1: Exemplarische Einzelmessungen der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz in homogenen Lösungen: a) 8-MOP in D_2O , b) ATMPn in EtOD

größert wird. In beiden Fällen wird die Abklingrate der Lumineszenz des Singulett-Sauerstoffs durch Quenching verkürzt. Eine genaue Diskussion hierzu ist in Kapitel 4.1.1 (8-MOP) und 4.1.2 (ATMPn) zu finden. Zur Bestimmung der Anstiegs- und Abklingraten der zeitabhängigen Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz (β_1 bzw. β_2) wurden die im ASCII-Format abgespeicherten Meßdaten mit Origin[®] eingelesen und ein least-square-fit nach Gleichung (2.19) auf Seite 28 bzw. (2.23) und (2.24) auf Seite 29 verwendet (durchgezogene helle Kurven in Abbildung 4.1). Als Fehler bei der Angabe der Anstiegs- und Abklingraten wird der bei der linearen Regression minimierte mittlere quadratische Fehler angenommen. Ein zusätzlicher systematischer Fehler, beispielsweise aufgrund von geringfügigen Verunreinigungen der Lösung oder Konzentrationsschwankungen, kann nur grob abgeschätzt werden und wird im Rahmen der vorliegenden Arbeit zu 3 % angenommen. Die Bestimmung der Ratenkonstanten erfolgte durch Fits der β_1 und β_2 , aufgetragen gegen die jeweils variierte Konzentration von Sauerstoff, Photosensibilisator oder Quencher, unter Verwendung von Gleichung (2.14) und (2.15) bzw. Gleichung (2.17) auf Seite 27/28. Diese Fitkurven sind in den jeweiligen Abbildungen durch Linien repräsentiert.

Als Fehler bei der Messung und Bestimmung der Sauerstoff-Konzentration wird bei der polarographischen pO₂-Messung (also im Falle des Photosensibilisators 8-MOP), da diese Art der Messung sehr genau ist, die maximale Schwankung des pO₂ während der Zeit einer Messung zugrundegelegt. Bei der faseroptischen Messung des Sauerstoffgehalts wird ein Fehler von 0,4 % der Luftsättigung angenommen (siehe Kapitel 3.4.3). In EtOD entspricht dies einer Sauerstoff-Konzentration von $\pm 7 \mu\text{M}$, in wässrigen Lösungsmitteln lediglich $\pm 0,6 \mu\text{M}$.

4.1.1 8-Methoxypsoralen

4.1.1.1 Variation der Sauerstoff-Konzentration

Im Rahmen dieser Experimente wurde eine Konzentration von 8-MOP in D₂O von $[8\text{-MOP}] = 137 \mu\text{M}$ verwendet. Die Sauerstoff-Konzentration wurde von $26 \mu\text{M}$ bis zu $508 \mu\text{M}$ variiert. Abbildung 4.2 zeigt die Anstiegs- und Abklingraten der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz in Abhängigkeit der Sauerstoff-Konzentration.

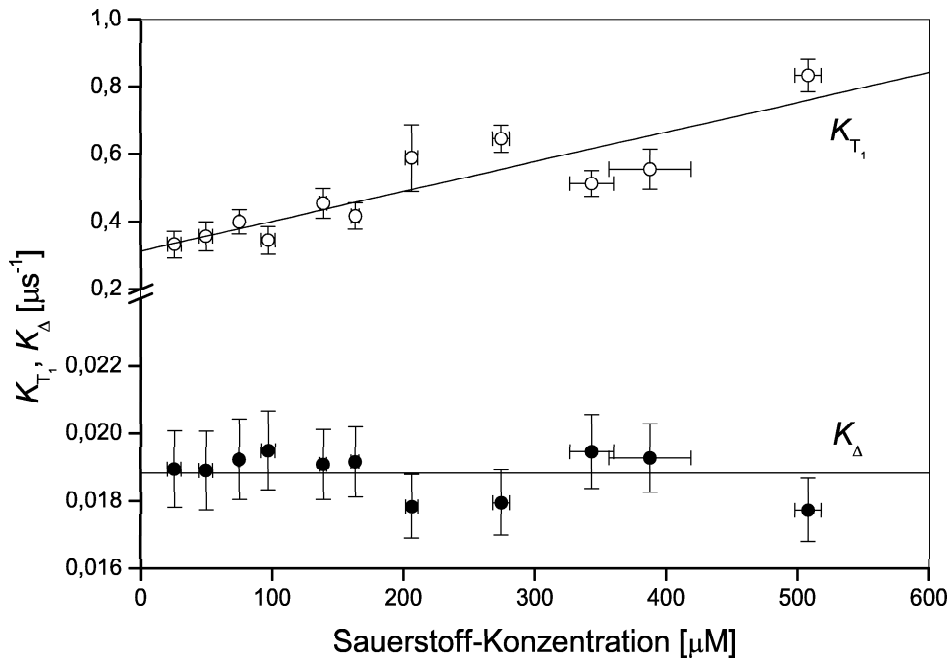


Abbildung 4.2: Anstiegs- (K_{T_1}) und Abklingraten (K_{Δ}) der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz bei fester 8-MOP-Konzentration von $137 \mu\text{M}$ und Variation der Sauerstoff-Konzentration

Zu erkennen ist, daß sich sowohl die Anstiegs- (K_{T_1}) wie auch die Abklingrate (K_{Δ}) der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz über dem gesamten beobachteten Konzentrationsbereich, insbesondere auch nahe dem Nullpunkt, linear verhalten. Somit kann die Rate des Energierücktransfers von Singulett-Sauerstoff auf den Triplett-T₁-Zustand von 8-MOP $k_{\Delta T_1} = 0$ gesetzt werden (vergleiche Abbildung 2.5 a) auf Seite 31). Dies ist bei der energetischen Lage des Triplett-T₁-Niveaus des 8-MOP-Moleküls von $E_{T_1} = 2,56 \text{ eV}$ [CBR83], verglichen mit der des $^1\Delta_g$ -Zustandes des Sauerstoff-Moleküls von $0,97 \text{ eV}$ auch zu erwarten, denn nach der Boltzmann-Verteilung gilt: $\frac{k_{\Delta T_1}}{k_{T_1 \Delta}} = e^{-\frac{E_{T_1} - E_{\Delta}}{k_B T}} \approx 10^{-27}$. Somit gilt also für die Anstiegsrate $\beta_1 \equiv K_{T_1}$ und für die Abklingrate $\beta_2 \equiv K_{\Delta}$.

Desweiteren ist zu erkennen, daß die Variation der Sauerstoff-Konzentration die Abklingrate K_Δ innerhalb des Fehlers nicht beeinflusst, konform mit Gleichung (2.22) auf Seite 29. Es ergibt sich $K_\Delta = k_\Delta + k_{\Delta S_0}[8-MOP] = 0,0188 \pm 0,0007 \mu s^{-1}$.

Benutzt man wegen $k_{\Delta T_1} = 0$ Gleichung (2.20) auf Seite 29, so ergibt sich aus der Steigung des linearen Fits von K_{T_1} die Ratenkonstante $k_{T_1 O_2}$ für die Deaktivierung des 8-MOP-Triplett- T_1 -Zustandes durch molekularen Sauerstoff zu $k_{T_1 O_2} = (9 \pm 4) \cdot 10^8 s^{-1} M^{-1}$. Diese Ratenkonstante wurde zum ersten mal bestimmt. Die Extrapolation auf $[O_2] = 0$ liefert die Relaxationsrate des 8-MOP-Triplett- T_1 -Zustandes $K_{T_1} = k_{T_1} + k_{T_1 S_0}[8-MOP] = 0,31 \pm 0,04 \mu s^{-1}$.

4.1.1.2 Variation der 8-MOP-Konzentration

Im Rahmen dieser Experimente wurden 8-MOP-Konzentrationen in D_2O von $14 \mu M$ bis $137 \mu M$ verwendet. Die Sauerstoff-Konzentration betrug $[O_2] = 210 \pm 20 \mu M$. Dies bedeutet, daß es sich um eine luftgesättigte Lösung handelte. Abbildung 4.3 zeigt die Anstiegs- und Abklingraten der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz in Abhängigkeit der 8-MOP-Konzentration.

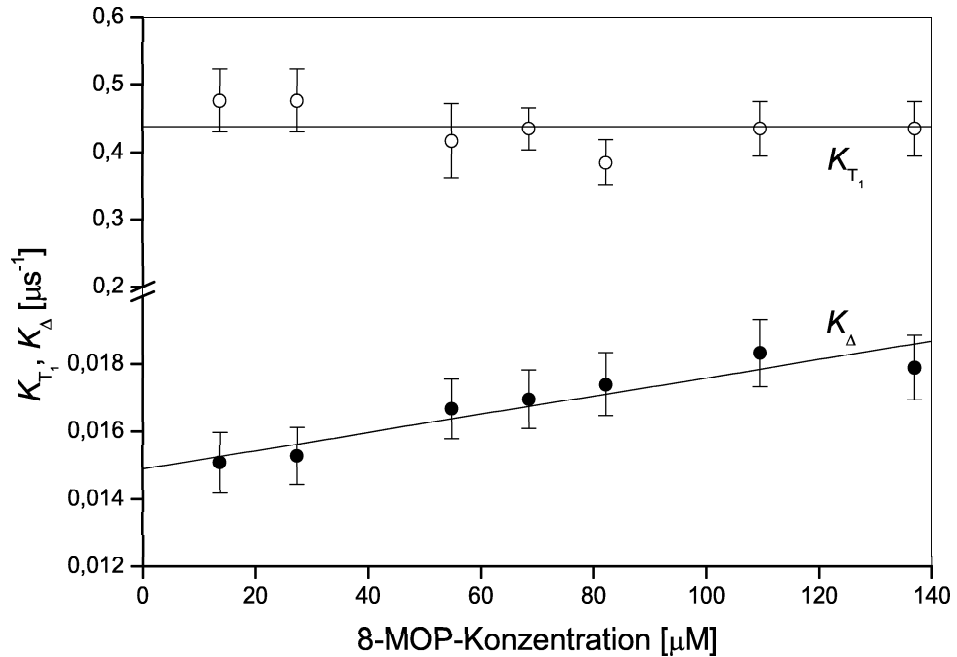


Abbildung 4.3: Anstiegs- (K_{T_1}) und Abklingraten (K_Δ) der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz bei fester Sauerstoff-Konzentration von $210 \pm 20 \mu M$ und Variation der 8-MOP-Konzentration

Erhöht man die 8-MOP-Konzentration in D₂O von 14 μM bis zu 137 μM , so bleibt die Relaxationsrate K_{T_1} des Triplett-T₁-Zustandes von 8-MOP innerhalb des experimentellen Fehlers mit $K_{T_1} = 0,44 \pm 0,04 \mu\text{s}^{-1}$ konstant. Mit der Größe der Fehlergrenzen läßt sich jedoch eine obere Grenze für die Ratenkonstante $k_{T_1S_0}$, d. h. die Ratenkonstante der Deaktivierung des 8-MOP-Triplett-T₁-Zustandes durch 8-MOP im Grundzustand (siehe Gleichung (2.20) auf Seite 29), angeben zu $k_{T_1S_0} < 6 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$. Dieser Wert ist kleiner als der Wert von $k_{T_1S_0} = 38 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$ in Methanol [CBR83] und der geschätzte Wert von $k_{T_1S_0} = 10 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$ in Ethanol [SAB79].

Wie in Abbildung 4.3 auf Seite 71 zu sehen ist, nimmt die Relaxationsrate K_Δ des Singulett-Sauerstoffs linear mit der 8-MOP-Konzentration zu. Aus der Steigung der Fitgeraden ergibt sich nach Gleichung (2.21) auf Seite 29 die Quenchingratenkonstante von Singulett-Sauerstoff durch 8-MOP (bzw. die durch 8-MOP gemeinsam mit seinen Photoprodukten, siehe Kapitel 3.1.1, Seite 36), $k_{\Delta S_0}$, zu $k_{\Delta S_0} = (0,27 \pm 0,10) \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$. Dies bedeutet, daß nach den vorliegenden Messungen das 8-MOP in D₂O eine wesentlich größere Quenchingratenkonstante besitzt als in CCl₄ mit $k_{\Delta S_0} = 0,056 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$ [WHR95]. Durch Extrapolation auf $[8\text{-MOP}] = 0$ erhält man als Kehrwert der Abklingrate k_Δ die Lebensdauer τ_Δ des Singulett-Sauerstoffs in reinem D₂O, $\tau_\Delta = 67 \pm 3 \mu\text{s}$. Dieser Wert entspricht der oberen Grenze der in [WHR95] angegebenen Literaturwerten von 43 bis 67 μs .

Benutzt man nun den Wert von K_{T_1} bei einer bestimmten Sauerstoff-Konzentration, die 8-MOP-Konzentration von 137 μM sowie die Abschätzung $0 \leq k_{T_1S_0} < 6 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$, so läßt sich mit Gleichung (2.20) auf Seite 29 eine untere Grenze der Relaxationsrate k_{T_1} des Triplet-T₁-Zustandes von 8-MOP in reinem D₂O abschätzen. Diese ergibt sich als Mittelwert aus den Meßwerten K_{T_1} für alle Sauerstoff-Konzentrationen zu $0,23 \pm 0,04 \mu\text{s}^{-1}$. Daraus folgt $0,19 \mu\text{s}^{-1} < k_{T_1} \leq 0,35 \mu\text{s}^{-1}$ und damit ein Mittelwert der Relaxationsrate k_{T_1} des 8-MOP-Triplett-T₁-Zustandes von $0,27 \pm 0,08 \mu\text{s}^{-1}$. Die Triplett-T₁-Lebensdauer $\tau_{T_1} = \frac{1}{k_{T_1}}$ von 8-MOP in reinem D₂O ist somit $\tau_{T_1} = 3,7 \pm 1,1 \mu\text{s}$. Ein Vergleich mit Literaturdaten kann hier nicht angestellt werden, da Angaben zur Triplett-T₁-Relaxationsrate k_{T_1} von 8-MOP in D₂O nicht bekannt sind. Jedoch existieren Angaben zu k_{T_1} in H₂O. Diese variieren zwischen $0,25 \mu\text{s}^{-1}$ und $2,5 \mu\text{s}^{-1}$ [WHR95, G94a].

4.1.1.3 Variation der Natriumazid-Konzentration

Im Rahmen dieser Experimente wurden Natriumazid-Konzentrationen von 1 μM bis 100 μM verwendet. Die 8-MOP-Konzentration betrug $[8\text{-MOP}] = 137 \mu\text{M}$. Die Sauerstoff-Konzentration in Lösung betrug $[O_2] = 210 \pm 20 \mu\text{M}$, d. h. daß die Lösungen wieder luftgesättigt waren. Abbildung 4.4 auf Seite 73 zeigt die Anstiegs- und Abklingraten der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz in Abhängigkeit der Natriumazid-Konzentration. Wie aus Abbildung 4.4 ersichtlich, ist die Relaxationsrate K_{T_1} des Triplett-T₁-Zustandes von 8-MOP K_{T_1} innerhalb der Fehlergrenzen unabhängig von der Natriumazid-Konzentration. Es ergibt sich $K_{T_1} = 0,44 \pm 0,04 \mu\text{s}^{-1}$. Dieser Wert ist identisch

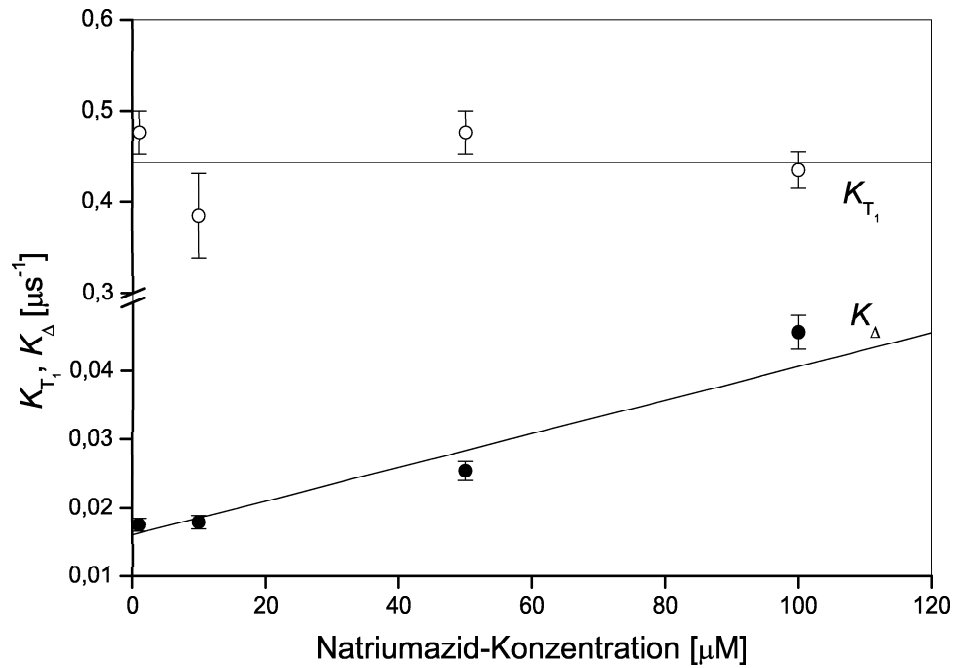


Abbildung 4.4: Anstiegs- (K_{T_1}) und Abklingraten (K_{Δ}) der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz bei fester 8-MOP-Konzentration von $137 \mu\text{M}$, fester Sauerstoff-Konzentration von $210 \pm 20 \mu\text{M}$ und Variation der Natriumazid-Konzentration

mit K_{T_1} , gewonnen durch die Variation der 8-MOP-Konzentration (siehe Abbildung 4.3). Aus der Größe der Fehlerbalken lässt sich jedoch mit Gleichung (2.20) auf Seite 29 eine obere Grenze für die Ratenkonstante der Deaktivierung des 8-MOP-Triplett- T_1 -Zustandes durch Natriumazid, k_{T_1Q} , angeben zu $k_{T_1Q} < 8 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$. Hierzu sind keine Literaturwerte bekannt.

Die Relaxationsrate K_{Δ} des Singulett-Sauerstoffs zeigt eine lineare Abhängigkeit von der Natriumazid-Konzentration. Aus der Steigung der Fitgeraden ergibt sich nach Gleichung (2.21) auf Seite 29 im Falle des Natriumazids eine Quenchingratenkonstante von Singulett-Sauerstoff von $k_{\Delta Q} = (2,5 \pm 0,6) \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$. Die Literaturwerte hierzu schwanken zwischen $0,5 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$ und $8,2 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$ [WHR95].

4.1.1.4 Variation der Histidin-Konzentration

Hierzu wurde analog zu Kapitel 4.1.1.3 eine 8-MOP-Konzentration von $[\delta\text{-MOP}] = 137 \mu\text{M}$ und eine Sauerstoff-Konzentration von $[\text{O}_2] = 210 \pm 20 \mu\text{M}$ verwendet. Die Histidin-Konzentration wurde zwischen $1 \mu\text{M}$ und $500 \mu\text{M}$ variiert. Abbildung 4.5 auf Seite 74 zeigt die Anstiegs- und Abklingraten der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz in Abhängigkeit der Histidin-Konzentration.

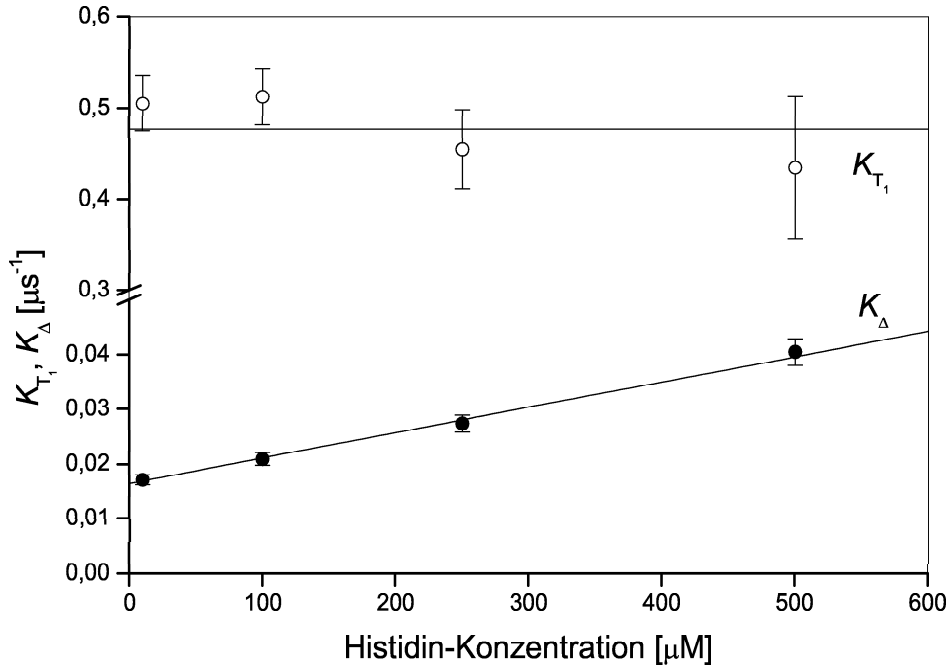


Abbildung 4.5: Anstiegs- (K_{T_1}) und Abklingraten (K_{Δ}) der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz bei fester 8-MOP-Konzentration von $137 \mu M$, fester Sauerstoff-Konzentration von $210 \pm 20 \mu M$ und Variation der Histidin-Konzentration

Wie zu sehen ist, ist die Triplet-T₁-Relaxationsrate K_{T_1} von 8-MOP innerhalb der Fehlergrenzen mit $K_{T_1} = 0,47 \pm 0,04 \mu s^{-1}$ unabhängig von der Histidin-Konzentration, ebenso wie bei Natriumazid. Dieser Wert von K_{T_1} ist innerhalb der Fehlergrenzen gleich mit den Werten, die durch Variation der Natriumazid- und der 8-MOP-Konzentration gewonnen wurden (siehe Abbildungen 4.4 und 4.3). Aus der Größe der Fehlerbalken läßt sich analog zu Natriumazid eine obere Grenze für die Ratenkonstante der Deaktivierung des 8-MOP-Triplett-T₁-Zustandes durch Histidin, k_{T_1Q} , angeben zu $k_{T_1Q} < 2 \cdot 10^8 s^{-1} M^{-1}$. Auch im Falle des Histidins sind keine Literaturangaben zu k_{T_1Q} bekannt.

Die Relaxationsrate K_{Δ} des Singulett-Sauerstoffs zeigt eine lineare Abhängigkeit von der Histidin-Konzentration. Aus der Steigung der Fitgeraden ergibt sich nach Gleichung (2.22) auf Seite 29 im Falle des Histidins eine Quenchingratenkonstante von Singulett-Sauerstoff von $k_{\Delta Q} = (0,46 \pm 0,04) \cdot 10^8 s^{-1} M^{-1}$. Die Literaturwerte zu $k_{\Delta Q}$ schwanken im Falle des Histidins zwischen $0,4 \cdot 10^8 s^{-1} M^{-1}$ und $9,3 \cdot 10^8 s^{-1} M^{-1}$ [WHR95].

4.1.1.5 Effizienz der Triplett-T₁-Deaktivierung durch Sauerstoff

Um, wie bereits in Kapitel 4.1 auf Seite 64 erwähnt, die Rolle des Singulett-Sauerstoffs in der Gesamtheit aller photochemischen Reaktionen bei der Photochemotherapie – hier der PUVA-Therapie mit 8-MOP – näher zu bestimmen, muß die Effizienz P_{T_1} (siehe Gleichung (2.28) auf Seite 31) der Triplett-T₁-Deaktivierung von 8-MOP durch molekularen Sauerstoff in Abhängigkeit der Sauerstoff-Konzentration und insbesondere bei *in vivo*-relevanten Sauerstoff-Konzentrationen betrachtet werden. Abbildung 4.6 zeigt die Abhängigkeit von P_{T_1} von der Sauerstoff-Konzentration. Die jeweiligen „Meßpunkte“ wurden nach Gleichung (2.28) auf Seite 31 unter Verwendung der Ratenkonstante $k_{T_1O_2}$ sowie der gemessenen Triplett-T₁-Relaxationsrate K_{T_1} bei der jeweiligen Sauerstoff-Konzentration $[O_2]$ berechnet. Die durchgezogene Kurve zeigt den berechneten Verlauf unter Verwendung sämtlicher bestimmter Raten und Ratenkonstanten in den Gleichungen (2.28) auf Seite 31 sowie (2.20) auf Seite 29.

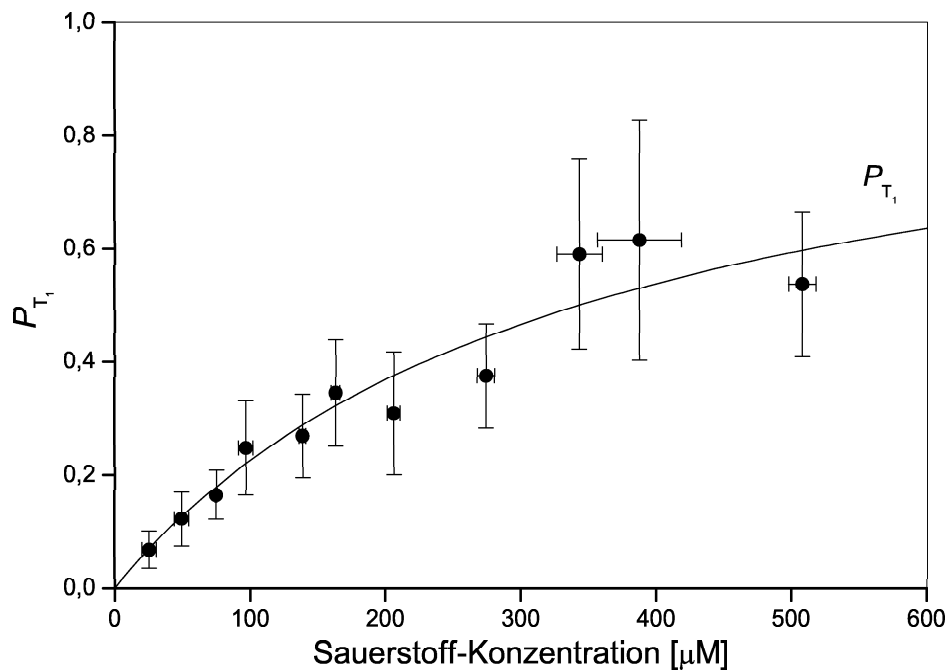


Abbildung 4.6: Effizienz P_{T_1} der Sauerstoff-induzierten Deaktivierung des Triplett-T₁-Zustandes von 8-MOP in D₂O in Abhängigkeit der Sauerstoff-Konzentration

Wie zu erkennen ist, ist für luftgesättigtes D₂O ($[O_2] = 210 \mu\text{M}$) der Wert von $P_{T_1} = 0,3 \pm 0,1$. Daraus läßt sich eine obere Grenze $\Phi_{\Delta}^{\text{max}}$ der Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute Φ_{Δ} für eine luftgesättigte Lösung angeben unter der Annahme, daß jede sauerstoff-induzierte Triplett-T₁-Deaktivierung von 8-MOP mit der Generierung von

Singulett-Sauerstoff einhergeht, d. h. daß $f_{\Delta}^{T_1} = 1$ ist (siehe Gleichung (2.27) auf Seite 31). Es ergibt sich unter Benutzung von $\Phi_{T_1} = 0,06$ [G94a, P91, MAB79] die obere Grenze der Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute zu $\Phi_{\Delta}^{\max} = 0,019 \pm 0,007$ für luftgesättigtes D_2O . Dieser Wert stimmt gut überein mit dem Literaturwert von $\Phi_{\Delta} = 0,020 \pm 0,006$ [P91], wobei zu bemerken ist, daß in [P91] keine expliziten Angaben zur Sauerstoff-Konzentration gemacht werden.

Jedoch wird die PUVA-Therapie *in vivo* durchgeführt, was bedeutet, daß dabei geringere Sauerstoff-Konzentrationen herrschen als in luftgesättigtem D_2O . Insbesondere ist der Sauerstoff-Partialdruck in der unteren Epidermis (vgl. Abbildung 1.2 auf Seite 9) höchstens 20 Torr (2666 Pa) [BES87], was einer Sauerstoff-Konzentration von etwa $30 \mu M$ entspricht. Bei dieser Sauerstoff-Konzentration beträgt $P_{T_1} = 0,05$ in D_2O . Damit beträgt nach Gleichung (2.25) auf Seite 31 auch die Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute Φ_{Δ} bei dieser Sauerstoff-Konzentration in D_2O lediglich ein Sechstel des Wertes bei Luftsättigung. Hierzu ist jedoch noch zu bemerken, daß die Relaxationsraten und -konstanten in verschiedenen Lösungsmitteln im allgemeinen verschieden sind, so daß P_{T_1} *in vivo* eine andere Abhängigkeit von der Sauerstoff-Konzentration zeigen dürfte wie in D_2O . Nichts desto trotz gilt nach Gleichung (2.28) auf Seite 31 für alle Lösungsmittel und damit auch *in vivo*, daß $P_{T_1}([O_2]) \rightarrow 0$ für $[O_2] \rightarrow 0$ und $P_{T_1}([O_2]) \rightarrow 1$ für $[O_2] \rightarrow \infty$.

Zusammenfassend seien in Tabelle 4.1 auf Seite 77 nochmals alle experimentell bestimmten Relaxationsraten und -konstanten für 8-MOP und Singulett-Sauerstoff in D_2O mit den zugehörigen Literaturwerten (soweit vorhanden) aufgeführt.

Rate/ Ratenkonstante	experimenteller Wert	Literaturwert	
$k_{T_1} [\mu s^{-1}]$	$0,27 \pm 0,08$	0,25 - 2,5	[WHR95, G94a]
$\tau_{T_1} [\mu s]$	$3,7 \pm 1,1$	4,0 - 0,4	[WHR95, G94a]
$k_{T_1O_2} [s^{-1}M^{-1}]$	$(9 \pm 4) \cdot 10^8$		
$k_{T_1S_0} [s^{-1}M^{-1}]$	$< 6 \cdot 10^8$	$38 \cdot 10^8$ ¹ $10 \cdot 10^8$ ²	[CBR83] [MAB79]
$k_{T_1Q} [s^{-1}M^{-1}]$ (NaN ₃)	$< 8 \cdot 10^8$	–	–
$k_{T_1Q} [s^{-1}M^{-1}]$ (Histidin)	$< 2 \cdot 10^8$	–	–
$k_{\Delta} [\mu s^{-1}]$	$(1,49 \pm 0,07) \cdot 10^{-2}$	$(1,5 - 2,3) \cdot 10^{-2}$	[WHR95]
$\tau_{\Delta} [\mu s]$	67 ± 3	67 - 43	[WHR95]
$k_{\Delta S_0} [s^{-1}M^{-1}]$	$(0,27 \pm 0,10) \cdot 10^8$	$0,056 \cdot 10^8$ ³	[WHR95]
$k_{\Delta Q} [s^{-1}M^{-1}]$ (NaN ₃)	$(2,5 \pm 0,6) \cdot 10^8$	$(0,5 - 8,2) \cdot 10^8$	[WHR95]
$k_{\Delta Q} [s^{-1}M^{-1}]$ (Histidin)	$(0,46 \pm 0,04) \cdot 10^8$	$(0,4 - 9,3) \cdot 10^8$	[WHR95]
Φ_{Δ}	$\leq 0,026$	0,02 0,01 ⁴ 0,035 ⁵	[KLT86] [KSE86] [BG87]

Tabelle 4.1: Vergleich der experimentell bestimmten Relaxationsraten und -konstanten des Photosensibilisators 8-MOP sowie Singulett-Sauerstoff in D₂O mit Literaturwerten; Lösungsmittel:

¹: Methanol, ²: Ethanol, ³: CCl₄, ⁴: Benzol, ⁵: D₂O-PBS

4.1.2 ATMPn

4.1.2.1 Variation der Sauerstoff-Konzentration

Zur Durchführung dieser Experimente wurde eine ATMPn-Konzentration in EtOD von $[ATMPn] = 100 \mu\text{M}$ verwendet. Die Sauerstoff-Konzentration wurde von $0 \mu\text{M}$ bis zu $166 \mu\text{M}$ variiert. Abbildung 4.7 zeigt die Anstiegs- und Abklingraten der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz in Abhängigkeit der Sauerstoff-Konzentration.

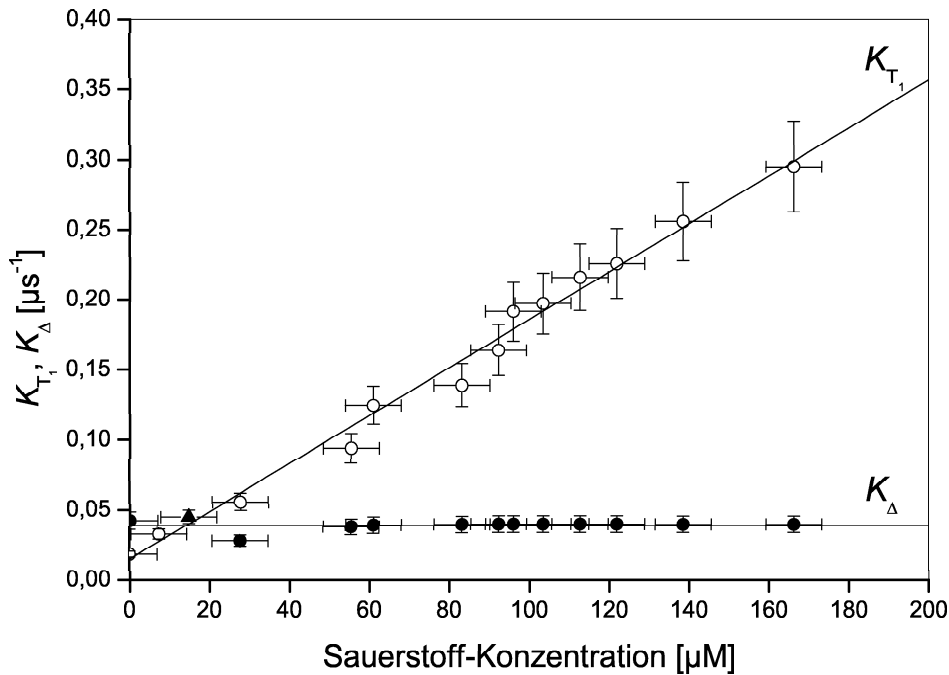


Abbildung 4.7: Anstiegs- (K_{T_1}) und Abklingraten (K_{Δ}) der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz bei fester ATMPn-Konzentration von $100 \mu\text{M}$ und Variation der Sauerstoff-Konzentration

Wie zu erkennen ist, verhalten sich sowohl die Anstiegs- wie auch die Abklingrate der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz über dem gesamten beobachteten Konzentrationsbereich linear. Außerdem existiert ein Schnittpunkt zwischen den Anstiegs- (K_{T_1}) und Abklingraten (K_{Δ}). Somit kann $k_{\Delta T_1} = 0$ gesetzt werden (vergleiche Abbildung 2.5 a) auf Seite 31). Betrachtet man die energetische Lage des Triplett- T_1 -Niveaus des ATMPn-Moleküls von $E_{T_1} = 1,25 \text{ eV}$ [BMM97], so ergibt sich nach der Boltzmann-Verteilung: $\frac{k_{\Delta T_1}}{k_{T_1 \Delta}} = e^{-\frac{E_{T_1} - E_{\Delta}}{k_B T}} \approx 10^{-5}$. Somit kann also für die Anstiegsrate $\beta_1 \equiv K_{T_1}$ und für die Abklingrate $\beta_2 \equiv K_{\Delta}$ gesetzt werden. Hier ist außerdem noch zu bemerken, daß bei dem durch das Dreieck gekennzeichneten Meßwert bei $[O_2] = 15 \mu\text{M}$ $K_{\Delta} =$

K_{T_1} war. Er wurde durch Verwendung von Gleichung (2.24) auf Seite 29 bestimmt. Desweiteren ist zu erkennen, daß konform mit Gleichung (2.21) auf Seite 29 die Variation der Sauerstoff-Konzentration die Abklingrate K_Δ innerhalb des Fehlers nicht beeinflusst. Es ergibt sich $K_\Delta = k_\Delta + k_{\Delta S_0} = 0,039 \pm 0,002 \mu s^{-1}$.

Die Bestimmung und Diskussion sämtlicher Raten und Ratenkonstanten erfolgt nun analog zu 8-MOP. Aus diesem Grunde wird im folgenden die Gewinnung der jeweiligen Ergebnisse nur noch sehr kurz diskutiert. Die Ratenkonstante der Deaktivierung des ATMPn-Triplett- T_1 -Zustandes durch molekularen Sauerstoff $k_{T_1 O_2}$ ergibt sich zu $k_{T_1 O_2} = (17 \pm 2) \cdot 10^8 s^{-1} M^{-1}$. Diese Ratenkonstante wurde zum ersten mal bestimmt. Extrapolation auf $[O_2] = 0$ liefert die Relaxationsrate des ATMPn-Triplett- T_1 -Zustandes $K_{T_1} = k_{T_1} + k_{T_1 S_0} [ATMPn] = 0,015 \pm 0,005 \mu s^{-1}$.

4.1.2.2 Variation der ATMPn-Konzentration

Hierzu wurden ATMPn-Konzentrationen in EtOD von $1 \mu M$ bis $100 \mu M$ verwendet. Die Sauerstoff-Konzentration betrug $[O_2] = 96 \pm 8 \mu M$, so daß bei diesen Lösungen die Sauerstoff-Konzentration weit unterhalb derer einer luftgesättigten Lösung lag. Die Sauerstoff-Konzentration wurde so niedrig gewählt, um einen ausreichend langen Anstieg der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz und somit die Meßbarkeit von K_{T_1} zu gewährleisten. Abbildung 4.8 auf Seite 80 zeigt die Anstiegs- und Abklingraten der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz in Abhängigkeit der ATMPn-Konzentration.

Bei Erhöhung der ATMPn-Konzentration in EtOD bleibt die Relaxationsrate K_{T_1} des Triplett- T_1 -Zustandes von ATMPn im betrachteten Konzentrationsbereich von $1 \mu M$ bis zu $100 \mu M$ innerhalb des Meßfehlers mit $K_{T_1} = 0,19 \pm 0,02 \mu s^{-1}$ konstant, wobei unter Beachtung der Fehlergrenzen $k_{T_1 S_0} < 7 \cdot 10^8 s^{-1} M^{-1}$ angegeben werden kann. Hierzu sind keine Literaturwerte bekannt. Durch Extrapolation auf $[ATMPn] = 0$ erhält man als Lebensdauer des Singulett-Sauerstoffs in reinem EtOD $\tau_\Delta = 31 \pm 2 \mu s$. Dieser Wert ist im Rahmen des Fehlers identisch mit den in [WHR95] angegebenen Literaturwerten von 29 bis $31 \mu s$.

Wie in Abbildung 4.8 ebenso zu sehen ist, nimmt die Relaxationsrate K_Δ des Singulett-Sauerstoffs linear mit der ATMPn-Konzentration zu. Es ergibt sich die Quenchingratenkonstante von Singulett-Sauerstoff durch ATMPn zu $k_{\Delta S_0} = (0,7 \pm 0,2) \cdot 10^8 s^{-1} M^{-1}$. Diese Ratenkonstante wurde ebenfalls erstmalig bestimmt.

Zur Abschätzung der Lebensdauer des Triplett- T_1 -Zustandes von ATMPn in EtOD geht man analog zu 8-MOP vor. Es ergibt sich zunächst $k_{T_1} > 0,018 \pm 0,005 \mu s^{-1}$. Daraus folgt $0,013 \mu s^{-1} < k_{T_1} \leq 0,020 \mu s^{-1}$ mit einem Mittelwert von $0,017 \pm 0,05 \mu s^{-1}$. Die Triplett- T_1 -Lebensdauer $\tau_{T_1} = \frac{1}{k_{T_1}}$ von ATMPn in reinem EtOD ist somit $\tau_{T_1} = 60 \pm 20 \mu s$. Ein Vergleich mit Literaturdaten kann hier nicht angestellt werden, da Angaben zur Triplett- T_1 -Relaxationsrate k_{T_1} von ATMPn nicht bekannt sind.

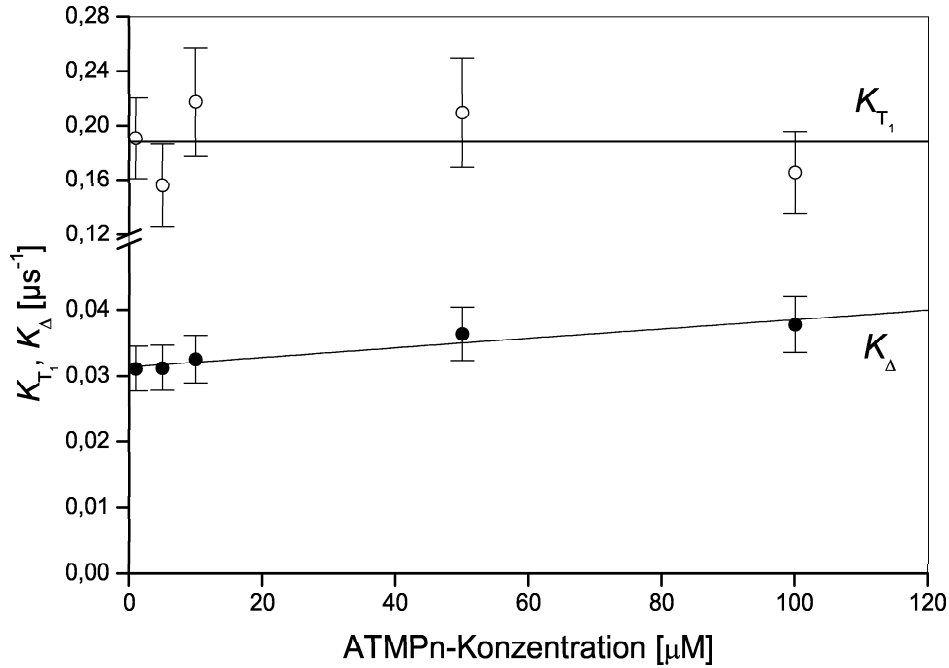


Abbildung 4.8: Anstiegs- (K_{T_1}) und Abklingraten (K_{Δ}) der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz bei fester Sauerstoff-Konzentration von $96 \pm 8 \mu\text{M}$ und Variation der ATMPn-Konzentration

4.1.2.3 Variation der Natriumazid-Konzentration

Im Rahmen dieser Experimente wurden Natriumazid-Konzentrationen von $5 \mu\text{M}$ bis $1000 \mu\text{M}$ verwendet. Die ATMPn-Konzentration betrug $[\text{ATMPn}] = 100 \mu\text{M}$. Die Sauerstoff-Konzentration in Lösung wurde zu $[\text{O}_2] = 88 \pm 8 \mu\text{M}$ gewählt. Abbildung 4.9 auf Seite 81 zeigt die Anstiegs- und Abklingraten der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz in Abhängigkeit der Natriumazid-Konzentration. Wie aus Abbildung 4.9 ersichtlich, steigen sowohl die Relaxationsrate K_{T_1} des Triplett- T_1 -Zustandes von ATMPn wie auch die Relaxationsrate K_{Δ} des Singulett-Sauerstoffs linear mit der Natriumazid-Konzentration an. Aus den Steigungen der Fitgeraden ergeben sich nach Gleichungen (2.20) und (2.21) auf Seite 29 die Ratenkonstanten k_{T_1Q} und $k_{\Delta Q}$ des Quenchings des ATMPn-Triplett- T_1 -Zustandes sowie des Sauerstoff- $^1\Delta_g$ -Zustandes durch Natriumazid zu $k_{T_1Q} = (0,20 \pm 0,04) \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$ und zu $k_{\Delta Q} = (2,1 \pm 0,3) \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$. Zu ersterem sind keine Literaturwerte bekannt. Jedoch existieren Literaturwerte zu $k_{\Delta Q}$ [WHR95] in Ethanol von $2,0 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$ bzw. $2,2 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$, so daß der vorliegende Meßwert von $k_{\Delta Q}$ innerhalb des Meßfehlers identisch mit den beiden Literaturwerten ist.

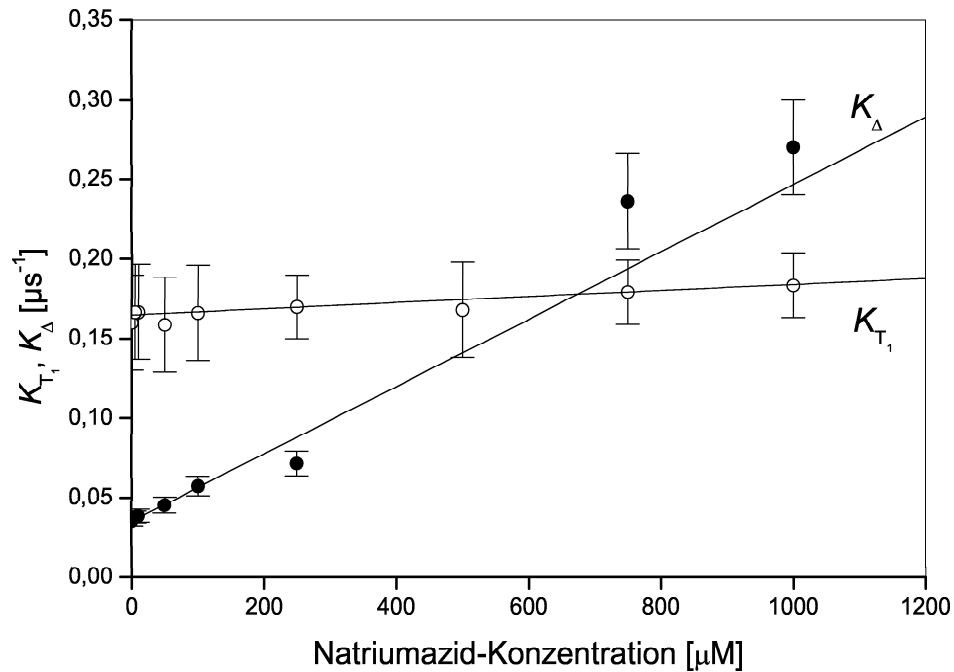


Abbildung 4.9: Anstiegs- (K_{T_1}) und Abklingraten (K_{Δ}) der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz bei fester ATMPn-Konzentration von $100 \mu\text{M}$, fester Sauerstoff-Konzentration von $88 \pm 8 \mu\text{M}$ und Variation der Natriumazid-Konzentration

4.1.2.4 Effizienz der Triplett- T_1 -Deaktivierung durch Sauerstoff

Um, analog zu 8-MOP, die Rolle des Singulett-Sauerstoffs in der Gesamtheit aller photochemischen Reaktionen bei der photodynamischen Therapie mit ATMPn näher zu bestimmen, wird die Effizienz P_{T_1} (siehe Gleichung (2.28) auf Seite 31) der Triplett- T_1 -Deaktivierung von ATMPn durch molekularen Sauerstoff in Abhängigkeit der Sauerstoff-Konzentration und insbesondere bei *in vivo*-relevanten Sauerstoff-Konzentrationen betrachtet. Abbildung 4.10 auf Seite 82 zeigt die Abhängigkeit von P_{T_1} von der Sauerstoff-Konzentration. Für luftgesättigtes EtOD ($[O_2] = 1850 \mu\text{M}$) ergibt sich der extrapolierte Wert von $P_{T_1} = 0,99 \pm 0,01$. Daraus ergibt sich unter Benutzung von $\Phi_{T_1} = 0,43$ (in Toluol, [BMM97]) und unter der Annahme $f_{\Delta}^{T_1} = 1$ ist (siehe Gleichung (2.27) auf Seite 31) die obere Grenze der Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute zu $\Phi_{\Delta}^{\text{max}} = 0,42 \pm 0,01$ für luftgesättigtes EtOD. Dieser Wert ist etwas höher als der einzige bekannte Literaturwert von $\Phi_{\Delta} = 0,37$ [BMM97], wobei zu bemerken ist, daß hier Toluol als Lösungsmittel benutzt wird und keine expliziten Angaben zur Sauerstoff-Konzentration gemacht werden.

Jedoch wird die photodynamische Therapie *in vivo* durchgeführt, was bedeutet, daß in Gewebe mit einem Sauerstoff-Partialdruck von 25 bis 65 Torr (3333 bis 8666 Pa) [VKO89] geringere Sauerstoff-Konzentrationen herrschen (etwa 50 bis $100 \mu\text{M}$) als in luftgesättigtem EtOD. Insbesondere beträgt der Sauerstoff-Partialdruck in malignem

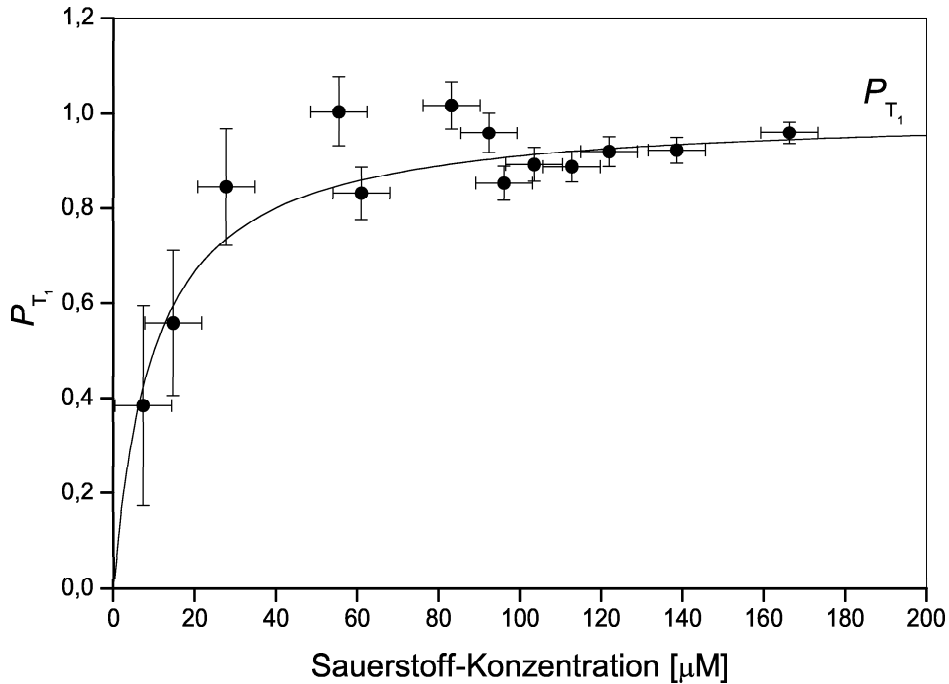


Abbildung 4.10: Effizienz P_{T_1} der Sauerstoff-induzierten Triplett- T_1 -Deaktivierung von ATMPn in EtOD in Abhängigkeit der Sauerstoff-Konzentration

Gewebe zwischen 5 und 30 Torr (667 bis 4000 Pa) [VKO89], was einer Sauerstoff-Konzentration von höchstens $50 \mu\text{M}$ entspricht. Bei dieser Sauerstoff-Konzentration ist nach Abbildung 4.10 $P_{T_1} = 0,8$ in EtOD. Damit beträgt nach Gleichung (2.29) auf Seite 31 auch die Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute Φ_{Δ} bei dieser Sauerstoff-Konzentration in D_2O lediglich etwa 80 % des Wertes bei Luftsättigung. Hierzu ist jedoch ebenfalls zu bemerken, daß die Relaxationsraten und -konstanten *in vivo* verschiedenen sein dürften von denen in EtOD, so daß P_{T_1} *in vivo* eine andere Abhängigkeit von der Sauerstoff-Konzentration zeigen dürfte wie in EtOD.

Zusammenfassend seien in Tabelle 4.2 auf Seite 83 nochmals alle experimentell bestimmten Relaxationsraten und -konstanten des ATMPn und des Singulett-Sauerstoffs mit den zugehörigen Literaturwerten (soweit vorhanden) aufgeführt.

Rate/ Ratenkonstante	experimenteller Wert	Literaturwert	
$k_{T_1} [\mu s^{-1}]$	$0,017 \pm 0,005$	–	–
$\tau_{T_1} [\mu s]$	60 ± 20	–	–
$k_{T_1O_2} [s^{-1}M^{-1}]$	$(17 \pm 2) \cdot 10^8$	–	–
$k_{T_1S_0} [s^{-1}M^{-1}]$	$< 7 \cdot 10^8$	–	–
$k_{T_1Q} [s^{-1}M^{-1}]$ (NaN ₃)	$(0,20 \pm 0,04) \cdot 10^8$	–	–
$k_{\Delta} [\mu s^{-1}]$	$0,032 \pm 0,002$	0,032 - 0,034	[WHR95]
$\tau_{\Delta} [\mu s]$	31 ± 2	29 - 31	[WHR95]
$k_{\Delta S_0} [s^{-1}M^{-1}]$	$(0,7 \pm 0,2) \cdot 10^8$	–	–
$k_{\Delta Q} [s^{-1}M^{-1}]$ (NaN ₃)	$(2,1 \pm 0,3) \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^8, 2,2 \cdot 10^8$ ¹	[WHR95]
Φ_{Δ}	$\leq 0,43$	0,37 ²	[BMM97]

Tabelle 4.2: Vergleich der experimentell bestimmten Relaxationsraten und -konstanten des Photosensibilisators ATMPn sowie des Singulett-Sauerstoffs in EtOD mit Literaturwerten; Lösungsmittel:
¹: Ethanol, ²: Toluol

4.1.3 Bengalrosa

Mit Bengalrosa wurden zunächst Meßreihen mit D₂O, dann mit EtOD als Lösungsmittel durchgeführt. Zur Klärung der mit der in Kapitel 2.4 vorgestellten Theorie nicht verträglichen Diskrepanzen bei Variation der Sauerstoff-Konzentration in beiden Lösungsmitteln wurden zusätzlich Messungen der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz bei verschiedenen Sauerstoff-Konzentrationen in einer Mischung von D₂O und H₂O im Verhältnis 9:1 durchgeführt. Die Ergebnisse werden im folgenden jeweils zunächst für EtOD, anschließend für D₂O bzw. D₂O:H₂O = 9:1 diskutiert.

4.1.3.1 Variation der Sauerstoff-Konzentration

Im Rahmen dieser Experimente wurde in EtOD eine Bengalrosa-Konzentration von $[BR] = 2 \mu\text{M}$ verwendet. Die Sauerstoff-Konzentration wurde von $2 \mu\text{M}$ bis zu $340 \mu\text{M}$ variiert. Abbildung 4.11 zeigt die Anstiegs- und Abklingraten der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz in Abhängigkeit der Sauerstoff-Konzentration.

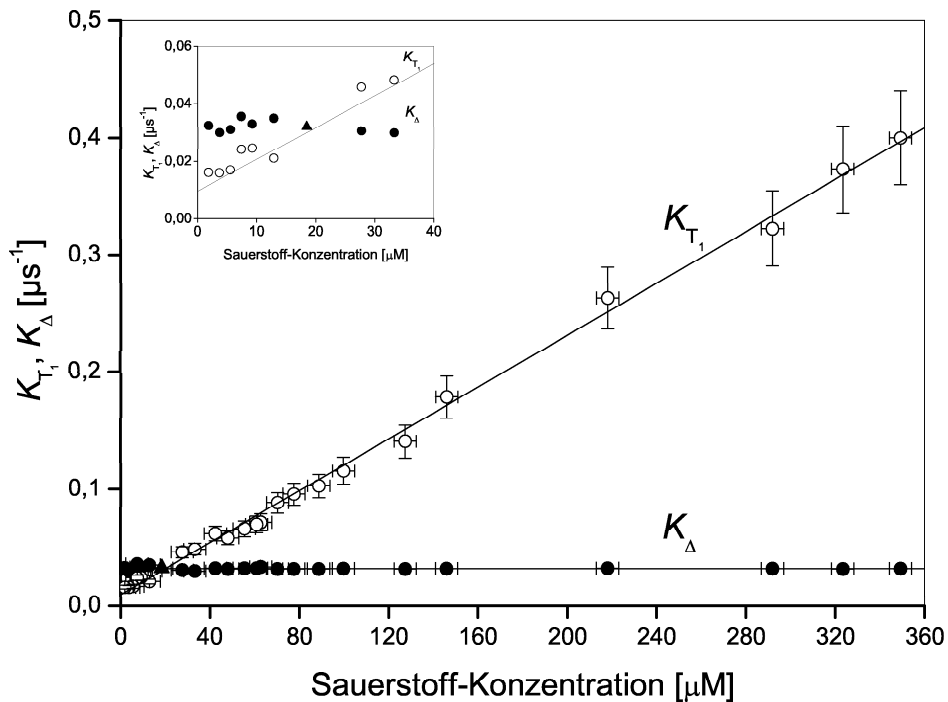


Abbildung 4.11: Anstiegs- (K_{T_1}) und Abklingraten (K_A) der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz bei fester Bengalrosa-Konzentration von $2 \mu\text{M}$ in EtOD und Variation der Sauerstoff-Konzentration; Der Einschub zeigt den Sauerstoff-Konzentrationsbereich von 0 bis $40 \mu\text{M}$ vergrößert

Wie bei 8-MOP in D₂O und ATMPn in EtOD verhalten sich auch bei Bengalrosa in EtOD sowohl die Anstiegs- wie auch die Abklingrate der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz über dem gesamten beobachteten Konzentrationsbereich linear. Desweiteren existiert ebenso wie bei ATMPn ein Schnittpunkt zwischen Anstiegs- (K_{T_1}) und Abklingraten (K_Δ). Somit kann $k_{\Delta T_1} = 0$ gesetzt werden (vergleiche Abbildung 2.5 a) auf Seite 31). Betrachtet man die energetische Lage des Triplett-T₁-Niveaus des Bengalrosa-Moleküls von $E_{T_1} = 1,75$ eV [SZY89, LDF99], so ergibt sich nach der Boltzmann-Verteilung: $\frac{k_{\Delta T_1}}{k_{T_1 \Delta}} = e^{-\frac{E_{T_1} - E_\Delta}{k_B T}} \approx 10^{-14}$. Somit kann also für die Anstiegsrate $\beta_1 \equiv K_{T_1}$ und für die Abklingrate $\beta_2 \equiv K_\Delta$ gesetzt werden. Desweiteren ist noch zu bemerken, daß der durch das Dreieck gekennzeichnete Meßwert von $K_\Delta = K_{T_1}$ bei $[O_2] = 15 \mu\text{M}$ durch Verwendung von Gleichung (2.24) auf Seite 29 bestimmt wurde. Ebenso zu erkennen ist, daß konform mit Gleichung (2.21) auf Seite 29 die Variation der Sauerstoff-Konzentration die Abklingrate K_Δ innerhalb des Fehlers nicht beeinflusst. Es ergibt sich $K_\Delta = K_\Delta = k_\Delta + k_{\Delta S_0}[BR] = 0,032 \pm 0,002 \mu\text{s}^{-1}$. Die Bestimmung der Ratenkonstante $k_{T_1 O_2}$ der Deaktivierung des Bengalrosa-Triplett-T₁-Zustandes durch molekularen Sauerstoff verläuft analog zu 8-MOP und ATMPn. Es ergibt sich $k_{T_1 O_2} = (11 \pm 1) \cdot 10^8 \text{ s}^{-1} \text{M}^{-1}$. Extrapolation auf $[O_2] = 0$ liefert die Relaxationsrate des Bengalrosa-Triplett-T₁-Zustandes K_{T_1} in EtOD zu $K_{T_1} = k_{T_1} + k_{T_1 S_0}[BR] = 0,010 \pm 0,003 \mu\text{s}^{-1}$.

In D₂O wurde, wie in EtOD, eine Bengalrosa-Konzentration von $[BR] = 2 \mu\text{M}$ verwendet. Die Sauerstoff-Konzentration wurde von $2,5 \mu\text{M}$ bis zu $260 \mu\text{M}$ variiert. Abbildung 4.12 auf Seite 86 zeigt die Anstiegs- und Abklingraten der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz in Abhängigkeit der Sauerstoff-Konzentration. Wie zu erkennen ist, sind die Anstiegs- und Abklingraten der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz bei Sauerstoff-Konzentrationen $[O_2] \lesssim 10 \mu\text{M}$ innerhalb der Meßgenauigkeit nahezu identisch. Es ist also weder möglich, einen Schnittpunkt zwischen den Anstiegs- und Abklingraten bei einer bestimmten Sauerstoff-Konzentration zu bestimmen, wie es bei $k_{\Delta T_1} = 0$ auftreten kann, noch ist ein sogenanntes *avoided crossing* der Fall, welches das Verhalten der Lumineszenzanstiegs- und abklingraten des Singulett-Sauerstoffs bei $k_{\Delta T_1} > 0$ charakterisiert (vgl. Abbildung 2.5 a) auf Seite 31). Um nun zu entscheiden, ob es sich hierbei um einen physikalischen Effekt handelt, der durch die in Kapitel 2.4 vorgestellte Theorie nicht abgedeckt ist, oder aber dieses Verhalten auf eine zu geringe Meßgenauigkeit zurückzuführen ist, wurde eine Lösung von $2 \mu\text{M}$ Bengalrosa in D₂O:H₂O = 9:1 hergestellt. Dadurch müßte sich die Relaxationsrate des Singulett-Sauerstoffs in diesem Lösungsmittel gemäß

$$k_\Delta = \frac{1}{\tau_\Delta} = \frac{1}{\tau_\Delta(\text{D}_2\text{O})} \cdot x_{\text{D}_2\text{O}} + \frac{1}{\tau_\Delta(\text{H}_2\text{O})} \cdot x_{\text{H}_2\text{O}} \quad (4.1)$$

(hierbei sind $x_{\text{D}_2\text{O}} = 0,9$ und $x_{\text{H}_2\text{O}} = 0,1$ die relativen Anteile von D₂O und H₂O in der Mischung) durch seine geringe Lebensdauer in H₂O ($\tau_\Delta(\text{H}_2\text{O}) = 3,5 \mu\text{s}$ [WHR95]) verglichen mit der in D₂O ($\tau_\Delta(\text{D}_2\text{O}) = 67 \mu\text{s}$ [EKM02]) auf $0,042 \mu\text{s}^{-1}$ steigern lassen.

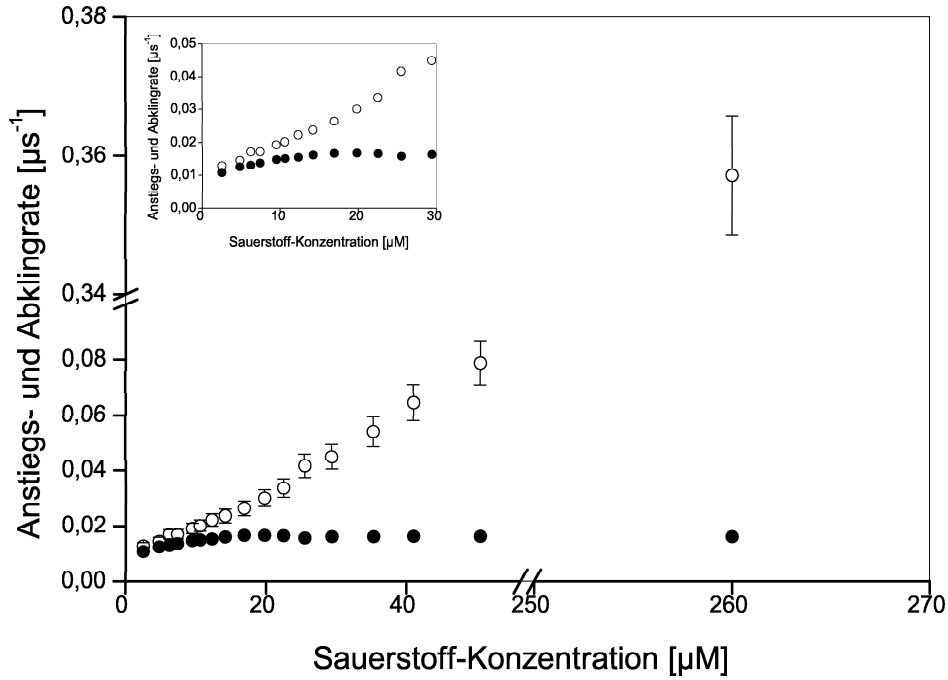


Abbildung 4.12: Anstiegs- (K_{T_1}) und Abklingraten (K_{Δ}) der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz bei fester Bengalrosa-Konzentration von $2 \mu\text{M}$ in D_2O und Variation der Sauerstoff-Konzentration; Bei Sauerstoff-Konzentrationen kleiner als etwa $20 \mu\text{M}$ reicht die Meßgenauigkeit nicht aus, um die Anstiegs- bzw. Abklingrate der Lumineszenz des Singulett-Sauerstoffs K_{T_1} bzw. K_{Δ} zuzuweisen (siehe Einschub)

Ein eventuell vorhandener, in D_2O aufgrund der zu geringen Meßgenauigkeit nicht bestimmbarer Schnittpunkt zwischen den Anstiegs- und Abklingraten wird damit vom Bereich sehr geringer Sauerstoff-Konzentration und damit sehr geringer Meßgenauigkeit in einen Bereich höherer Sauerstoff-Konzentration und Meßgenauigkeit verschoben.

Abbildung 4.13 auf Seite 87 zeigt nun die Anstiegs- und Abklingraten der Lumineszenz des Singulett-Sauerstoffs, generiert durch $2 \mu\text{M}$ Bengalrosa in $\text{D}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O} = 9:1$, in Abhängigkeit der Sauerstoff-Konzentration. Diese wurde zwischen $3 \mu\text{M}$ und $240 \mu\text{M}$ variiert. Wie in EtOD verhalten sich auch bei Bengalrosa in $\text{D}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O} = 9:1$ sowohl die Anstiegs- wie auch die Abklingrate der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz über dem gesamten beobachteten Konzentrationsbereich linear. In der Tat ist also das in Abbildung 4.12 beobachtete Verhalten auf eine zu geringe Meßgenauigkeit zurückzuführen. Desweiteren ist $k_{\Delta T_1} = 0$, $\beta_1 \equiv K_{T_1}$ und $\beta_2 \equiv K_{\Delta}$. Außerdem ist die Abklingrate K_{Δ} des Singulett-Sauerstoffs innerhalb des Meßfehlers konstant und es gilt $K_{\Delta} = k_{\Delta} + k_{\Delta S_0}[\text{BR}] = 0,037 \pm 0,005 \mu\text{s}^{-1}$. Der oben berechnete Wert der Abklingrate

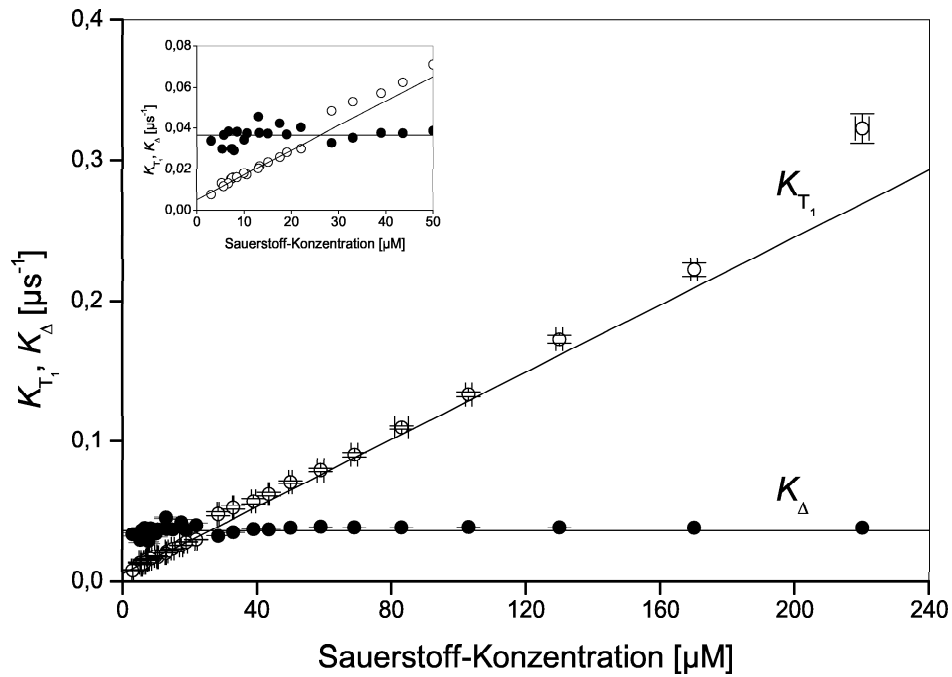


Abbildung 4.13: Anstiegs- (K_{T_1}) und Abklingraten (K_{Δ}) der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz bei fester Bengalrosa-Konzentration von $2 \mu\text{M}$ in $\text{D}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O} = 9:1$ und Variation der Sauerstoff-Konzentration; K_{T_1} und K_{Δ} schneiden sich bei einer Sauerstoff-Konzentration von etwa $25 \mu\text{M}$ (siehe Einschub)

des Singulett-Sauerstoffs $\frac{1}{\tau_{\Delta}}$ liegt somit innerhalb der Fehlergrenzen der gemessenen Abklingrate K_{Δ} .

Die Ratenkonstante $k_{T_1\text{O}_2}$ der Deaktivierung des Bengalrosa-Triplett- T_1 -Zustandes durch molekularen Sauerstoff ergibt sich analog zu 8-MOP zu $k_{T_1\text{O}_2} = (12 \pm 1) \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$. Diese ist im Rahmen des Meßfehlers identisch mit derjenigen von Bengalrosa in EtOD. Extrapolation auf $[\text{O}_2] = 0$ liefert die Relaxationsrate des Bengalrosa-Triplett- T_1 -Zustandes K_{T_1} in $\text{D}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O} = 9:1$ zu $K_{T_1} = k_{T_1} + k_{T_1\text{S}_0}[\text{BR}] = (5,2 \pm 0,5) \cdot 10^{-3} \mu\text{s}^{-1}$.

4.1.3.2 Abschätzung der Raten des Energieübertrags bzw. des Ladungstransfers von Bengalrosa auf Sauerstoff innerhalb des Komplexes

Nach [SPW78, LST90, LK96, LK97] erzeugt Bengalrosa neben Singulett-Sauerstoff auch Superoxidanion und es gilt nach [SPW78] für die Quantenausbeuten beider Reaktionen in Methanol: $\frac{\Phi_{\Delta}}{\Phi_{\text{O}_2^-}} = \frac{77}{23}$. Benutzt man nun den Absolutwert von $\Phi_{\Delta} = 0,76$ in Methanol [GS64] sowie die Aussage, daß im Rahmen der Wechselwirkung zwischen Bengalrosa im Triplett- T_1 -Zustand und molekularem Sauerstoff ein Radikal-Anion von

Bengalrosa $\text{BR}^{\bullet-}$ nicht entsteht [SZ91], so folgt: $k_{\text{T}_1\text{O}_2} = k_{\text{T}_1\Delta} + k_{\text{T}_1\text{O}_2^-}$, wobei $\frac{k_{\text{T}_1\Delta}}{k_{\text{T}_1\text{O}_2^-}} = \frac{77}{23}$. Geht man davon aus, daß dies auch in EtOD der Fall ist, so läßt sich mit dem Meßwert von $k_{\text{T}_1\text{O}_2}$ sowohl die Ratenkonstante $k_{\text{T}_1\Delta}$ abschätzen zu $k_{\text{T}_1\Delta} = 8,5 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$ als auch $k_{\text{T}_1\text{O}_2^-}$ zu $k_{\text{T}_1\text{O}_2^-} = 2,5 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$. Daraus läßt sich für luftgesättigtes EtOD ($[\text{O}_2] = 1850 \mu\text{M}$) unter Verwendung der Triplett- T_1 -Quantenausbeute von $\Phi_{\text{T}_1} = 0,86$ (in Methanol, [GLV83]) die Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute Φ_{Δ} abschätzen zu $\Phi_{\Delta} = 0,68 \pm 0,07$. Dieser Wert liegt geringfügig niedriger als die Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute in Methanol von 0,76 [GS64].

Zur Abschätzung der Diffusionsratenkonstante k_{Diff} (siehe Gleichungen (2.1) bis (2.3) auf Seite 21), mit der Bengalrosa im Triplett- T_1 -Zustand und Sauerstoff im Grundzustand durch Diffusion zusammentreffen und einen Überlapp ihrer Wellenfunktionen bilden, schätzt man zunächst die Viskosität von EtOD ab. Aus der bekannten Viskosität von EtOH ($\eta_{\text{EtOH}} = 1200 \cdot 10^{-6} \text{ Pa}\cdot\text{s} = 1200 \cdot 10^{-5} \text{ Poise}$ [LB62]) läßt sich die Viskosität von EtOD unter Verwendung des Verhältnisses der Viskositäten von H_2O und D_2O von $\frac{\eta_{\text{D}_2\text{O}}}{\eta_{\text{H}_2\text{O}}} = \frac{1,272}{1,003}$ abschätzen zu $\eta_{\text{EtOD}} = 1522 \cdot 10^{-5} \text{ P}$. Prinzipiell wäre es nun möglich, die Diffusionsratenkonstante k_{Diff} unter Verwendung von Gleichung (2.6) oder (2.7) auf Seite 21 abzuschätzen. Leider stellt Gleichung (2.6) eine sehr grobe Abschätzung dar, wohingegen für die genauere Gleichung (2.7) die zu verwendende Diffusionskonstante von Bengalrosa in EtOD in der Literatur nicht gefunden wurde. Verwendet man nun mit Gleichung (2.6) das Verhältnis der beiden Viskositäten von CCl_4 ($\eta_{\text{CCl}_4} = 961 \cdot 10^{-5} \text{ P}$ [LB62]) und EtOD, so läßt sich mit dem Wert der Diffusionsratenkonstante k_{Diff} in CCl_4 von $k_{\text{Diff}}^{\text{CCl}_4} = 2,72 \cdot 10^{10} \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$ [SFS01] die Diffusionsratenkonstante in EtOD $k_{\text{Diff}}^{\text{EtOD}}$ zu $k_{\text{Diff}}^{\text{EtOD}} = 2,2 \cdot 10^{10} \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$ bestimmen. Dieser Wert ist nahe am Maximalwert diffusionskontrollierter Deaktivierungsprozesse von $3 \cdot 10^{10} \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$ [B76].

Zur Abschätzung der Dissoziationsrate K_{Diss} des Komplexes von Bengalrosa im Triplett- T_1 -Zustand und Sauerstoff im Grundzustand benutzt man Gleichung (2.8) auf Seite 21. Hierzu ist jedoch noch eine Abschätzung des internuklearen Abstandes von Bengalrosa und Sauerstoff innerhalb des Komplexes notwendig. Dieser ergibt sich mit $r_{\text{O}_2} \approx 0,2 \text{ nm}$ [W62] und $r_{\text{RB}} \approx 0,4 \text{ nm}$ (nach [SD95] ist bei Bengalrosa die Xanthengruppe das Chromophor und für 2- bzw. 3-Ring-Strukturen ist nach [DLJ99] etwa 4 \AA zu verwenden) zu $r = r_{\text{O}_2} + r_{\text{RB}} \approx 0,6 \text{ nm}$. Somit ergibt sich die Dissoziationsrate K_{Diss} zu $K_{\text{Diss}} \approx 7,2 \cdot 10^9 \text{ s}^{-1}$.

Dadurch läßt sich nun unter Verwendung von Gleichung (2.5) auf Seite 21 die Rate $k_{\text{ET}}[\text{O}_2]$ des Energietransfers von Bengalrosa im Triplett- T_1 -Zustand auf molekularen Sauerstoff innerhalb des Komplexes dieser beiden Moleküle abschätzen zu $k_{\text{ET}}[\text{O}_2] = 3,8 \cdot 10^9 \text{ s}^{-1}$. Desweiteren läßt sich mit Gleichung (2.4) auf Seite 21 die Rate $k_{\text{CT}}[\text{O}_2]$ des Ladungstransfers (in Gleichung (2.4) mit dem allgemeinen Ausdruck $k_{\text{enISC}}[\text{O}_2]$ bezeichnet) von Bengalrosa im Triplett- T_1 -Zustand auf molekularen Sauerstoff innerhalb des Komplexes der beiden Moleküle abschätzen zu $k_{\text{CT}}[\text{O}_2] = 0,4 \cdot 10^9 \text{ s}^{-1}$. Mit der Kenntnis

entsprechender Daten lassen sich also unter Umständen aus den bestimmten Ratenkonstanten sogar die Übertragungsraten von Energie und Ladung innerhalb eines Komplexes von Photosensibilisator und Sauerstoff abschätzen. Leider fehlen hierzu jegliche Literaturdaten, um einen Vergleich anzustellen.

4.1.3.3 Variation der Bengalrosa-Konzentration

Hierzu wurden Bengalrosa-Konzentrationen in EtOD und D₂O von 0,1 μM bis 20 μM verwendet. In EtOD betrug die Sauerstoff-Konzentration $[O_2] = 64 \pm 7 \mu\text{M}$, so daß wiederum die Luftsättigungskonzentration an Sauerstoff unterschritten wurde, um die Meßbarkeit von K_{T_1} zu gewährleisten. Abbildung 4.14 zeigt die Anstiegs- und Abklingraten der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz in Abhängigkeit der Bengalrosa-Konzentration in EtOD.

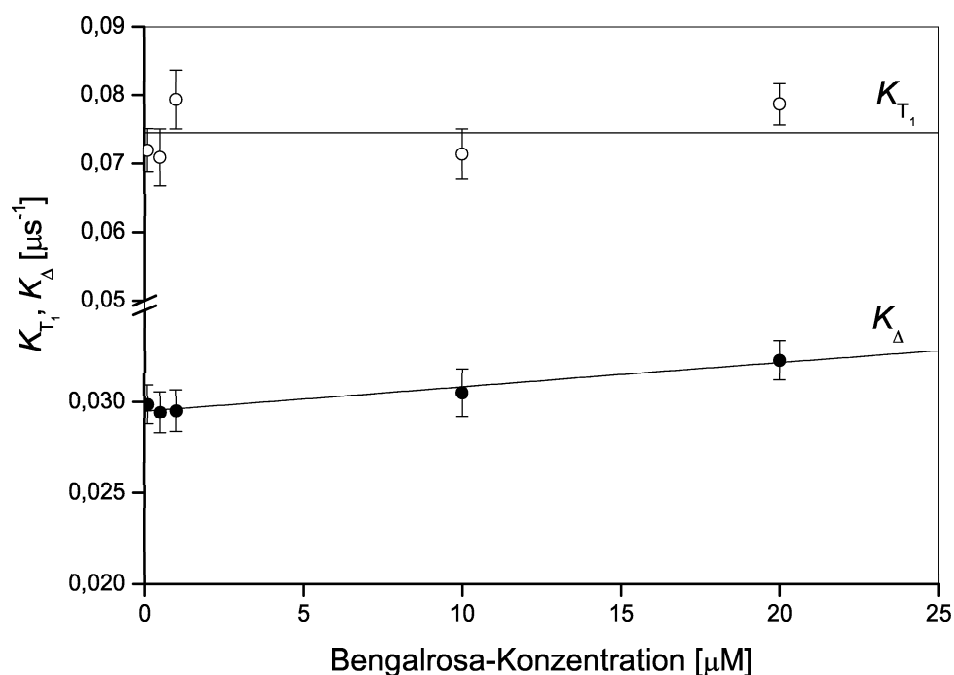


Abbildung 4.14: Anstiegs- (K_{T_1}) und Abklingraten (K_{Δ}) der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz bei fester Sauerstoff-Konzentration von $65 \pm 2 \mu\text{M}$ und Variation der Bengalrosa-Konzentration in EtOD

Die Bestimmung der Ratenkonstanten ist im folgenden analog zu der bei 8-MOP (Kapitel 4.1.1) und sei deshalb nur sehr kurz beschrieben. Wie in Abbildung 4.14 zu erkennen, bleibt die Relaxationsrate K_{T_1} des Triplett-T₁-Zustandes im betrachteten Konzentrationsbereich von 0,1 μM bis zu 20 μM innerhalb des Meßfehlers mit $K_{T_1} = 0,074 \pm 0,004 \mu\text{s}^{-1}$ konstant. Aus den Fehlergrenzen läßt sich jedoch

$k_{T_1S_0} < 8 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$ abschätzen. Hierzu sind keine Literaturwerte bekannt.

Aus der Steigung der Fitgeraden der K_Δ ergibt sich nach Gleichung (2.21) auf Seite 29 die Quenchingratenkonstante von Singulett-Sauerstoff durch Bengalrosa in EtOD zu $k_{\Delta S_0} = (1,3 \pm 0,6) \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$. Auch zur Quenchingratenkonstante $k_{\Delta S_0}$ von Singulett-Sauerstoff durch Bengalrosa in EtOD sind keine Literaturwerte bekannt. Durch Extrapolation auf $[BR] = 0$ erhält man $\tau_\Delta = \frac{1}{k_\Delta} 33 \pm 1 \text{ } \mu\text{s}$ für EtOD. Dieser Wert ist im Rahmen des Fehlers identisch mit dem in Kapitel 4.1.2.2 bestimmten Wert und etwas höher als die in [WHR95] angegebenen Literaturwerte von 29 bis 31 μs .

Analog zu 8-MOP und ATMPn läßt sich eine Abschätzung der unteren Grenze der Relaxationsrate k_{T_1} des Triplet-T₁-Zustandes von Bengalrosa in reinem EtOD vornehmen. Diese ergibt sich wieder als Mittelwert aus den Meßwerten K_{T_1} für alle Sauerstoff-Konzentrationen zu $k_{T_1}^{\min} \approx 0 \text{ } \mu\text{s}^{-1}$. Daraus folgt $0 < k_{T_1} \leq 0,03 \text{ } \mu\text{s}^{-1}$ und damit eine minimale Lebensdauer τ_{T_1} des Bengalrosa-Triplett-T₁-Zustandes von 33 μs .

Die Sauerstoff-Konzentration betrug in D₂O $[O_2] = 248 \pm 6 \text{ } \mu\text{M}$. Abbildung 4.15 zeigt die Anstiegs- und Abklingraten der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz in Abhängigkeit der Bengalrosa-Konzentration in D₂O.

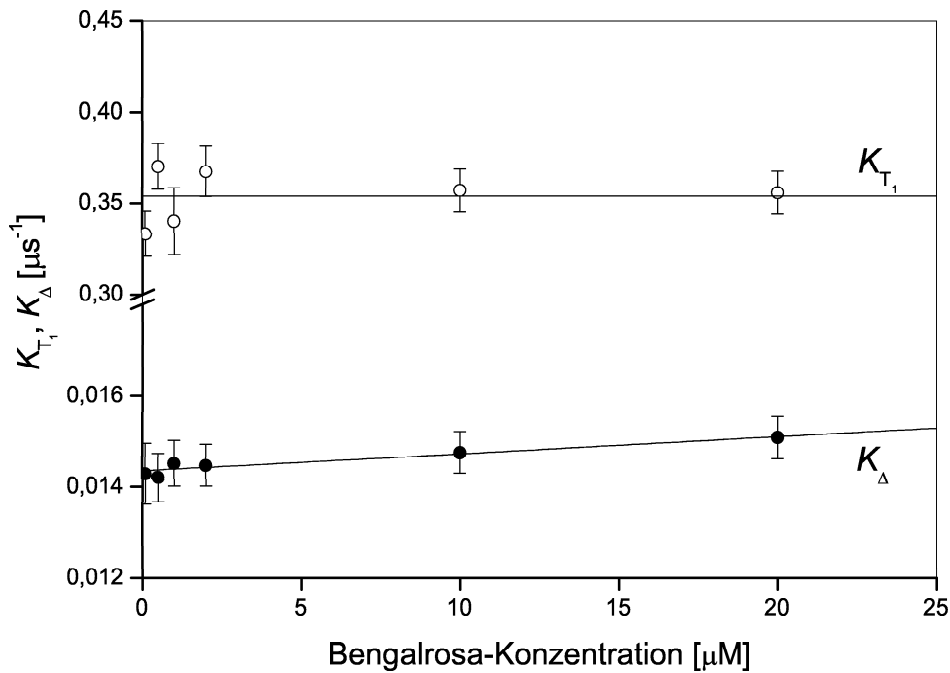


Abbildung 4.15: Anstiegs- (K_{T_1}) und Abklingraten (K_Δ) der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz bei fester Sauerstoff-Konzentration von $248 \pm 6 \text{ } \mu\text{M}$ und Variation der Bengalrosa-Konzentration in D₂O

Bei Erhöhung der Bengalrosa-Konzentration in D_2O bleibt, wie in EtOD, die Relaxationsrate K_{T_1} des Triplett- T_1 -Zustandes im betrachteten Konzentrationsbereich von $0,1 \mu M$ bis zu $20 \mu M$ innerhalb des Meßfehlers mit $K_{T_1} = 0,35 \pm 0,01 \mu s^{-1}$ konstant. Jedoch läßt sich aus den Fehlergrenzen $k_{T_1S_0} < 23 \cdot 10^8 s^{-1}M^{-1}$ angeben. Hierzu sind keine Literaturwerte bekannt.

Aus der linearen Zunahme der Relaxationsrate K_Δ des Singulett-Sauerstoffs mit der Bengalrosa-Konzentration ergibt sich die Quenchingratenkonstante von Singulett-Sauerstoff durch Bengalrosa in D_2O zu $k_{\Delta S_0} = (0,4 \pm 0,3) \cdot 10^8 s^{-1}M^{-1}$. Hierzu sind ebenfalls keine Literaturwerte bekannt. Durch Extrapolation auf $[BR] = 0$ erhält man als Kehrwert der Abklingrate k_Δ die Lebensdauer τ_Δ des Singulett-Sauerstoffs in reinem D_2O , $\tau_\Delta = (69 \pm 2) \mu s$. Dieser Wert entspricht im Rahmen des Fehlers der oberen Grenze der in [WHR95] angegebenen Literaturwerte von 43 bis 67 μs .

Benutzt man nun zur Abschätzung der Relaxationsrate des Triplett- T_1 -Zustandes von Bengalrosa in $D_2O:H_2O = 9:1$ die Werte von K_{T_1} in $D_2O:H_2O = 9:1$ bei einer bestimmten Sauerstoff-Konzentration, die Bengalrosa-Konzentration von $2 \mu M$ sowie die Abschätzung $0 \leq k_{T_1S_0} < 23 \cdot 10^8 s^{-1}M^{-1}$, so läßt sich wieder eine Abschätzung der unteren Grenze der Relaxationsrate k_{T_1} des Triplett- T_1 -Zustandes von Bengalrosa in reinem $D_2O:H_2O = 1:1$ angeben zu $0,011 \pm 0,010 \mu s^{-1}$. Daraus folgt $0 < k_{T_1} \leq 0,025 \mu s^{-1}$ und damit eine minimale Lebensdauer τ_{T_1} des Bengalrosa-Triplett- T_1 -Zustandes in D_2O von 40 μs .

4.1.3.4 Variation der Natriumazid-Konzentration

Im Rahmen dieser Experimente wurden Natriumazid-Konzentrationen von $5 \mu M$ bis $1000 \mu M$ verwendet. Die Bengalrosa-Konzentration betrug sowohl in EtOD wie auch in D_2O $[BR] = 2 \mu M$. Die Sauerstoff-Konzentration in Lösung betrug in EtOD $185 \pm 15 \mu M$, in D_2O $260 \pm 20 \mu M$. Abbildung 4.16 auf Seite 92 zeigt die Anstiegs- und Abklingraten der Lumineszenz von Singulett-Sauerstoff generiert durch photoaktiviertes Bengalrosa in EtOD in Abhängigkeit der Natriumazid-Konzentration. Wie zu erkennen ist, ist der Singulett-Sauerstoff-Quencher Natriumazid auch dazu in der Lage, massiv den Triplett- T_1 -Zustand von Bengalrosa zu deaktivieren. Aus der Steigung der linearen Fitgeraden ergeben sich nach Gleichungen (2.20) und (2.21) auf Seite 29 bei Verwendung von EtOD als Lösungsmittel die Ratenkonstanten des Quenchings des Bengalrosa-Triplett- T_1 -Zustandes durch Natriumazid k_{T_1Q} zu $k_{T_1Q} = (0,7 \pm 0,4) \cdot 10^8 s^{-1}M^{-1}$ sowie des Quenchings von Singulett-Sauerstoff durch Natriumazid $k_{\Delta Q}$ zu $k_{\Delta Q} = (2,0 \pm 0,1) \cdot 10^8 s^{-1}M^{-1}$. Zu ersterer sind keine Literaturwerte bekannt. Die Quenchingratenkonstante $k_{\Delta Q}$ ist im Rahmen des Fehlers identisch mit derjenigen bestimmt in Kapitel 4.1.2.3 (ATMPn). Durch Extrapolation auf $[NaN_3] = 0$ erhält man $K_{T_1} = 5 \pm 1 \mu s$ und $K_\Delta = 32 \pm 1 \mu s$.

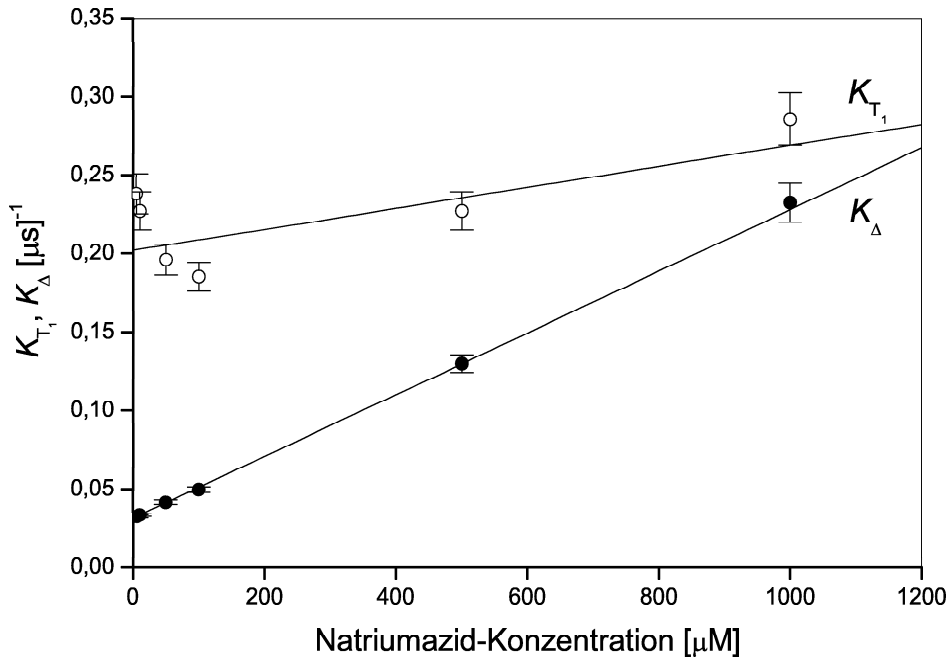


Abbildung 4.16: Anstiegs- (K_{T_1}) und Abklingraten (K_{Δ}) der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz bei fester Bengalrosa-Konzentration von $2 \mu\text{M}$, fester Sauerstoff-Konzentration von $260 \pm 20 \mu\text{M}$ und Variation der Natriumazid-Konzentration in EtOD

Abbildung 4.17 auf Seite 93 zeigt die Anstiegs- und Abklingraten der Lumineszenz von Singulett-Sauerstoff generiert durch photoaktiviertes Bengalrosa in D_2O in Abhängigkeit der Natriumazid-Konzentration. Wie zu erkennen ist, stellt auch in D_2O der Singulett-Sauerstoff-Quencher Natriumazid einen massiven Deaktivator des Triplett- T_1 -Zustandes von Bengalrosa dar. Aus der Steigung der linearen Fitgeraden ergeben sich nach Gleichungen (2.20) und (2.21) auf Seite 29 bei Verwendung des Lösungsmittels D_2O die Ratenkonstanten k_{T_1Q} zu $k_{T_1Q} = (2,7 \pm 0,4) \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$ sowie $k_{\Delta Q}$ zu $k_{\Delta Q} = (2,5 \pm 0,1) \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$. Zu ersterer sind keine Literaturwerte bekannt, jedoch ist k_{T_1Q} bei Verwendung von D_2O etwa viermal so groß wie bei Verwendung von EtOD als Lösungsmittel. Die bestimmte Quenchingratenkonstante $k_{\Delta Q}$ ist im Rahmen des Fehlers identisch mit derjenigen bestimmt in Kapitel 4.1.1.3 (8-MOP). Es sei hier ausdrücklich darauf hingewiesen, daß hier Natriumazid bezüglich des Triplett- T_1 -Zustandes von Bengalrosa einen genauso starken Quencher darstellt als bezüglich Singulett-Sauerstoff. Durch Extrapolation auf $[\text{NaN}_3] = 0$ erhält man $K_{T_1} = 3 \pm 1 \mu\text{s}$ und $K_{\Delta} = 63 \pm 1 \mu\text{s}$.

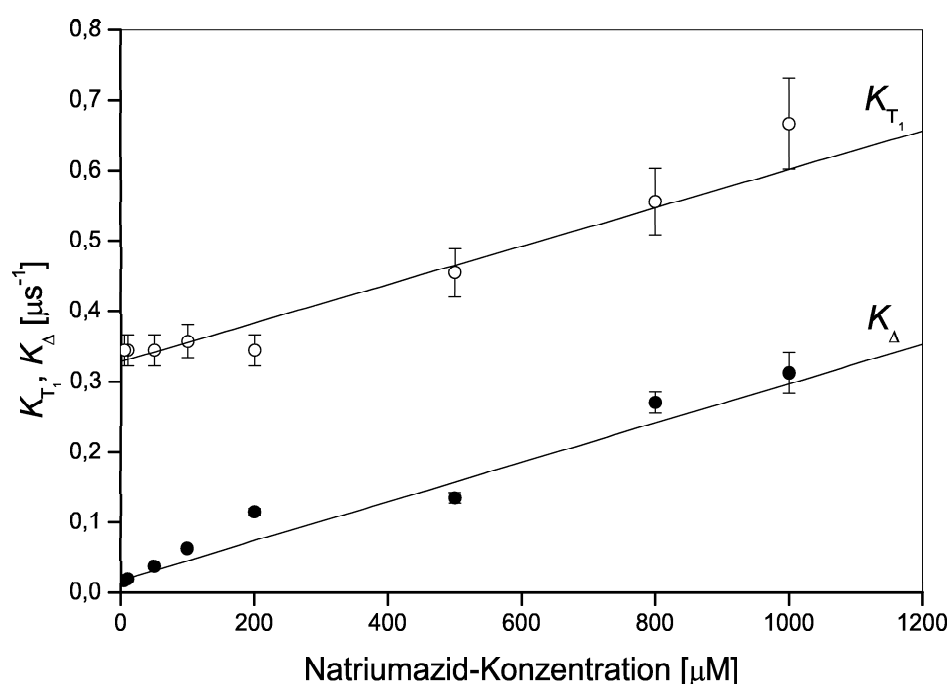


Abbildung 4.17: Anstiegs- (K_{T_1}) und Abklingraten (K_A) der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz bei fester Bengalrosa-Konzentration von $2 \mu M$, fester Sauerstoff-Konzentration von $260 \pm 20 \mu M$ und Variation der Natriumazid-Konzentration in D_2O

4.1.3.5 Effizienz der Triplett- T_1 -Deaktivierung durch Sauerstoff

Bei der Diskussion um die Bestimmung der Rolle des Singulett-Sauerstoffs in der Gesamtheit aller photochemischen Reaktionen bei der Photochemotherapie mit 8-MOP oder ATMPn mit Hilfe der Effizienz P_{T_1} (siehe Gleichung (2.28) auf Seite 31) der Triplett- T_1 -Deaktivierung des jeweiligen Photosensibilisators wurde bereits erwähnt, daß Relaxationsraten und -konstanten in verschiedenen Lösungsmitteln im allgemeinen verschiedenen sind. Dies hat zur Folge, daß P_{T_1} in verschiedenen Lösungsmitteln und damit auch *in vivo* jeweils unterschiedliche Abhängigkeiten von der Sauerstoff-Konzentration zeigen dürfte. Aus diesem Grund seien in Abbildung 4.18 auf Seite 94 die Abhängigkeiten von der Sauerstoff-Konzentration der Effizienzen P_{T_1} der Deaktivierung des Triplett- T_1 -Zustandes von Bengalrosa in EtOD (weiße Dreiecke) und in $D_2O:H_2O = 9:1$ (schwarze Dreiecke) verglichen. Der zugehörige, mit den jeweiligen Fitparametern gezeichnete Funktionsgraph ist für D_2O durchgehend, für EtOD gestrichelt gezeichnet. Der eingesetzte Funktionsgraph zeigt die Differenz beider Funktionsgraphen von P_{T_1} in D_2O und EtOD. Wie man an der Differenz der Funktionsgraphen von P_{T_1} in D_2O und EtOD erkennt, ist der Unterschied zwischen den P_{T_1} in beiden Lösungsmitteln bei einer Sauerstoff-Konzentration von etwa $8 \mu M$, was etwa der untersten Grenze der Sauerstoff-Konzentration in malignem Gewebe entspricht, am größ-

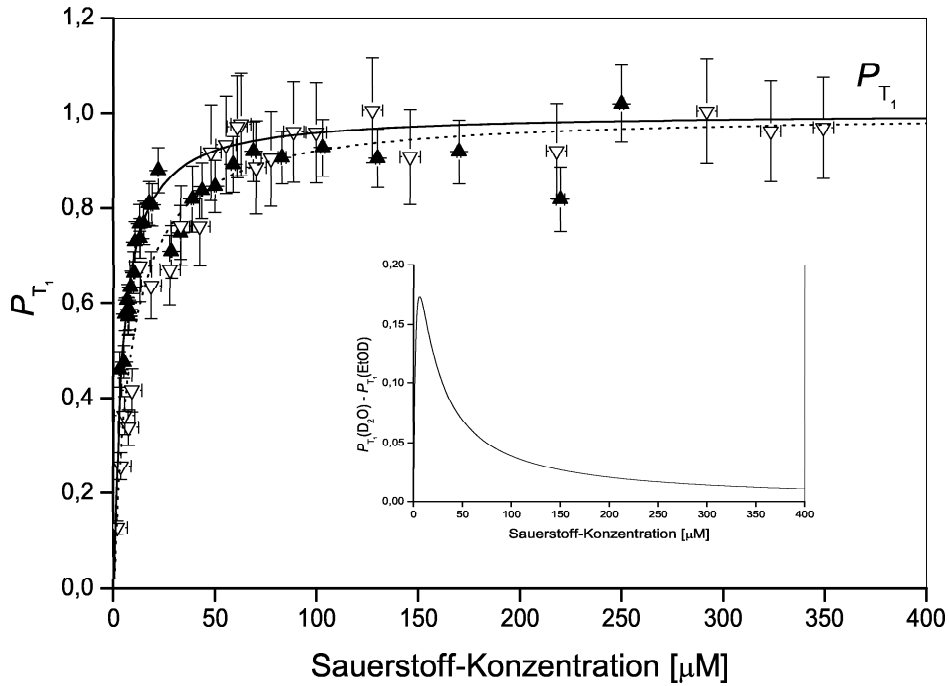


Abbildung 4.18: Vergleich der Effizienzen P_{T_1} der Sauerstoff-induzierten Deaktivierung des Triplett- T_1 -Zustandes von Bengalrosa in EtOD (weiße Dreiecke, gestrichelte Kurve) und $D_2O:H_2O = 9:1$ (schwarze Dreiecke, durchgezogene Kurve) in Abhängigkeit der Sauerstoff-Konzentration

ten. Allerdings kann aufgrund der großen Fehlerbalken in den experimentellen Daten kaum ein Unterschied festgestellt werden. Bei kleineren und auch bei größeren, über die maximale *in vivo*-relevante Sauerstoff-Konzentration von $50 \mu M$ hinausgehenden Sauerstoff-Konzentrationen, wird die Differenz der P_{T_1} wieder kleiner.

4.1.3.6 Quantenausbeute

In Kapitel 4.1.3.1 wurden für Bengalrosa in EtOD die Ratenkonstante $k_{T_1\Delta}$ sowie die Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute Φ_Δ für luftgesättigtes EtOD abgeschätzt. Mit $k_{T_1\Delta} = 8,5 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1} M^{-1}$ (s.o.) und der Verwendung von $\Phi_{T_1} = 0,86$ (für Methanol [GLV83]) ergibt sich die in Abbildung 4.19 auf Seite 95 dargestellte Abhängigkeit der Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute von Bengalrosa in EtOD in Abhängigkeit der Sauerstoff-Konzentration. Zu sehen ist wieder die Abnahme von Φ_Δ bei abnehmender Sauerstoff-Konzentration.

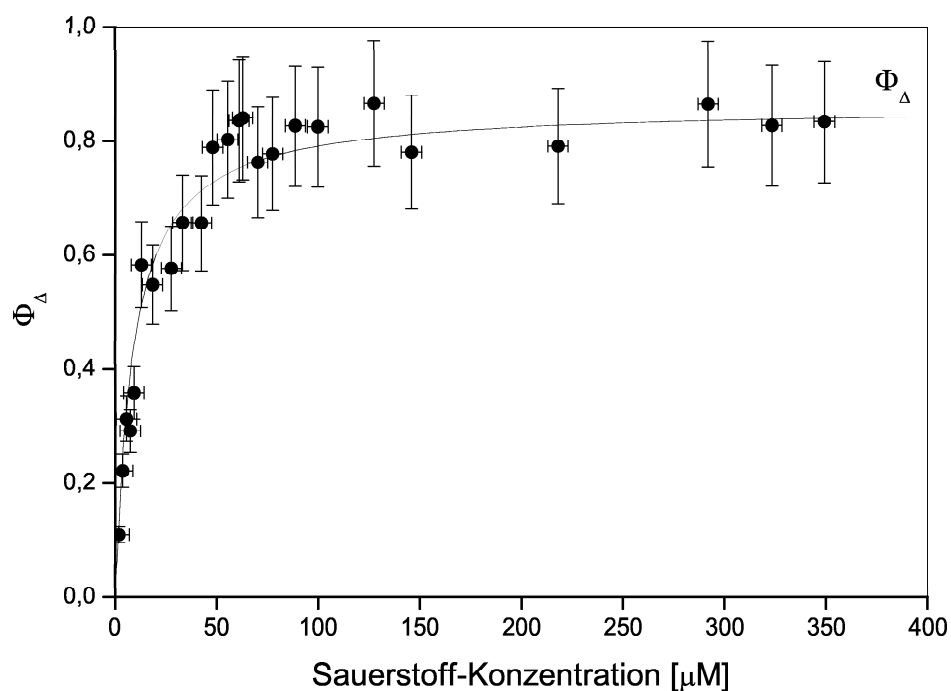


Abbildung 4.19: Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute Φ_{Δ} von Bengalrosa in EtOD in Abhängigkeit der Sauerstoff-Konzentration

Zusammenfassend seien in Tabelle 4.3 und 4.4 auf Seite 96 nochmals alle experimentell bestimmten Relaxationsraten und -konstanten des Bengalrosas sowie des Singulett-Sauerstoffs in EtOD (Tabelle 4.3) bzw. in D_2O (Tabelle 4.4) mit den zugehörigen Literaturwerten (soweit vorhanden) aufgeführt.

Rate/ Ratenkonstante	experimenteller Wert	Literaturwert
$k_{T_1} [\mu s^{-1}]$	$< 0,03$	–
$\tau_{T_1} [\mu s]$	≥ 33	–
$k_{T_1O_2} [s^{-1}M^{-1}]$	$(11 \pm 1) \cdot 10^8$	–
$k_{T_1\Delta} [s^{-1}M^{-1}]$	$8,5 \cdot 10^8$	–
$k_{T_1O_2^-} [s^{-1}M^{-1}]$	$25 \cdot 10^8$	–
$k_{T_1S_0} [s^{-1}M^{-1}]$	$< 8 \cdot 10^8$	–
$k_{T_1Q} [s^{-1}M^{-1}]$ (NaN ₃)	$(0,7 \pm 0,4) \cdot 10^8$	–
$k_{\Delta} [\mu s^{-1}]$	$0,030 \pm 0,001$	$0,032 - 0,034$ [WHR95]
$\tau_{\Delta} [\mu s]$	33 ± 1	$29 - 31$ [WHR95]
$k_{\Delta S_0} [s^{-1}M^{-1}]$	$(1,3 \pm 0,6) \cdot 10^8$	–
$k_{\Delta Q} [s^{-1}M^{-1}]$ (NaN ₃)	$(2,0 \pm 0,1) \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^8, 2,2 \cdot 10^8$ ¹ [WHR95]
Φ_{Δ}	$\leq 0,75$	–

Tabelle 4.3: Vergleich der experimentell bestimmten Relaxationsraten und -konstanten des Photosensibilisators Bengalrosa sowie des Singulett-Sauerstoffs in EtOD mit Literaturwerten; Lösungsmittel:

¹: Ethanol

Rate/ Ratenkonstante	experimenteller Wert	Literaturwert
$k_{T_1} [\mu s^{-1}]$	$0,013 \pm 0,012$	–
$\tau_{T_1} [\mu s]$	77 ± 70	–
$k_{T_1O_2} [s^{-1}M^{-1}]$	$(12 \pm 1) \cdot 10^8$ ¹	–
$k_{T_1S_0} [s^{-1}M^{-1}]$	$< 23 \cdot 10^8$	–
$k_{T_1Q} [s^{-1}M^{-1}]$ (NaN ₃)	$(2,7 \pm 0,4) \cdot 10^8$	–
$k_{\Delta} [\mu s^{-1}]$	$0,014 \pm 0,001$	$(1,5 - 2,3) \cdot 10^{-2}$ [WHR95]
$\tau_{\Delta} [\mu s]$	69 ± 2	$67 - 43$ [WHR95]
$k_{\Delta S_0} [s^{-1}M^{-1}]$	$(0,4 \pm 0,3) \cdot 10^8$	–
$k_{\Delta Q} [s^{-1}M^{-1}]$ (NaN ₃)	$(2,5 \pm 0,1) \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^8, 2,2 \cdot 10^8$ [WHR95]

Tabelle 4.4: Vergleich der experimentell bestimmten Relaxationsraten und -konstanten des Photosensibilisators Bengalrosa sowie des Singulett-Sauerstoffs in D₂O bzw. in D₂O:H₂O = 9:1 mit Literaturwerten; Lösungsmittel: ¹: D₂O:H₂O = 9:1

4.1.4 Vergleich einiger experimentell bestimmter Ratenkonstanten

Tabelle 4.5 zeigt einige ausgewählte, mit den bisher verwendeten Photosensibilisatoren experimentell bestimmte Ratenkonstanten. Die Anordnung der Photosensibilisatoren erfolgte nach fallender Triplett- T_1 -Energie. Wie man erkennt, steigt die Ratenkonstante $k_{T_1O_2}$ mit sinkendem energetischem Abstand zwischen dem Triplett- T_1 -Zustand des Photosensibilisators und dem $^1\Delta_g$ -Zustand des Sauerstoffs an. Desweiteren sind die Quenchingratenkonstanten $k_{\Delta Q}$ sehr ähnlich, und auch die übrigen beiden Ratenkonstanten unterscheiden sich um maximal eine Größenordnung.

Ratenkonstante [$10^8 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$]	$k_{T_1O_2}$	$k_{T_1Q} (\text{NaN}_3)$	$k_{\Delta S_0}$	$k_{\Delta Q} (\text{NaN}_3)$
Photosensibilisator				
8-MOP (D_2O)	9 ± 4	< 8	$0,27 \pm 0,10$	$2,5 \pm 0,6$
Bengalrosa (EtOD)	11 ± 1	$0,7 \pm 0,4$	$1,3 \pm 0,6$	$2,0 \pm 0,1$
Bengalrosa (D_2O)	12 ± 1 ¹	$2,7 \pm 0,4$	$0,4 \pm 0,3$	$2,5 \pm 0,1$
ATMPn (EtOD)	17 ± 2	$0,20 \pm 0,04$	$0,7 \pm 0,2$	$2,1 \pm 0,3$

Tabelle 4.5: Ausgewählte, mit den bisher verwendeten Photosensibilisatoren experimentell bestimmte Ratenkonstanten; Lösungsmittel: ¹: $\text{D}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O} = 9:1$

4.1.5 Protoporphyrin IX

4.1.5.1 Variation der Sauerstoff-Konzentration

Im Rahmen dieser Experimente wurde eine PPIX-DME-Konzentration in EtOD von $[PPIX]_0 = 300 \mu\text{M}$ verwendet. Die Sauerstoff-Konzentration wurde von $0 \mu\text{M}$ (nicht mehr meßbar mit Microx TX) bis zu $186 \mu\text{M}$ variiert. Abbildung 4.20 zeigt die Anstiegs- und Abklingraten der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz in Abhängigkeit der Sauerstoff-Konzentration.

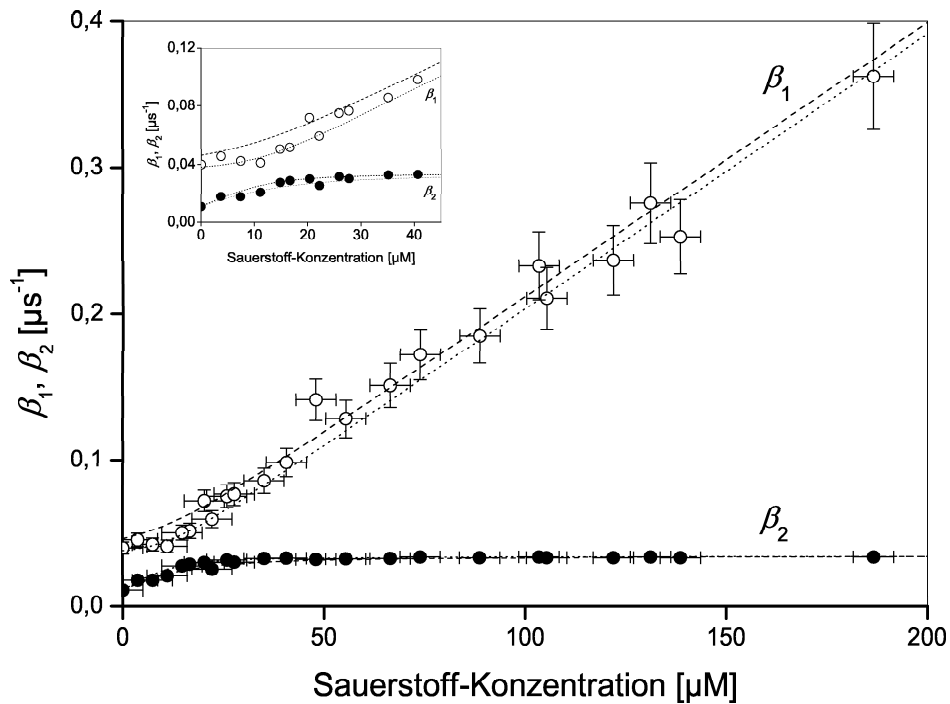


Abbildung 4.20: Anstiegs- (β_1) und Abklingraten (β_2) der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz bei fester PPIX-DME-Konzentration und Variation der Sauerstoff-Konzentration; Der Einschub zeigt den Sauerstoff-Konzentrationsbereich von 0 bis $45 \mu\text{M}$ vergrößert

Wie zu erkennen ist, tritt hier der Fall des *avoided crossing* auf, d. h. daß die Energierücktransferrate von Singulett-Sauerstoff auf den Triplett- T_1 -Zustand von PPIX-DME $k_{\Delta T_1} > 0$ ist (vergleiche Abbildung 2.5 a) auf Seite 31). Dies ist wegen des geringen energetischen Unterschieds ΔE zwischen dem Triplett- T_1 -Niveau des PPIX-DME-Moleküls bei $E_{T_1} = 1,07 \text{ eV}$ [A01b] und dem $^1\Delta_g$ -Zustand des Sauerstoff-Moleküls bei $0,97 \text{ eV}$ auch zu erwarten, denn nach der Boltzmann-Verteilung gilt:

$\frac{k_{\Delta T_1}}{k_{T_1 \Delta}} = e^{-\frac{\Delta E}{k_B T}} \approx 0,020$. In diesem Fall können generell nur die Raten k_{T_1} und k_{Δ} sowie die Ratenkonstanten $k_{T_1 O_2}$ und $k_{\Delta Q}$ direkt aus den jeweiligen Meßwertdiagrammen bestimmt werden.

Jedoch ist es möglich, die oberen und unteren Grenzen der Ratenkonstanten $k_{T_1 \Delta}$, $k_{\Delta T_1}$ und $k_{\Delta S_0}$ abzuschätzen. Die zu diesen Grenzfällen zugehörigen Fitkurven sind in den vorhergehenden sowie in den folgenden Abbildungen durch gestrichelte Kurven für die obere Grenzen bzw. durch gepunktete Kurven für die unteren Grenzen dargestellt.

Da für β_1 nach Gleichung (2.17) auf Seite 28 gilt:

$$\lim_{[O_2] \rightarrow \infty} \left(\frac{d\beta_1}{d[O_2]} \right) \longrightarrow k_{T_1 O_2} \quad (4.2)$$

läßt sich aus Abbildung 4.20 die Ratenkonstante $k_{T_1 O_2}$ aus der Steigung von β_1 für große Sauerstoff-Konzentrationen ($[O_2] > 50 \mu\text{M}$) bestimmen zu $k_{T_1 O_2} = (19 \pm 1) \cdot 10^8 \text{ s}^{-1} \text{M}^{-1}$. Desweiteren liefert die Extrapolation auf $[O_2] = 0$ nach Gleichung (2.14) und (2.17) auf Seite 27/28 aus β_2 die Abklingrate $K_{T_1} = k_{T_1} + k_{T_1 S_0} [PPIX] = 0,011 \pm 0,002 \mu\text{s}^{-1}$. Falls $k_{T_1 S_0} = 0$ gilt, läßt sich eine obere Grenze der Triplett- T_1 -Relaxationsrate k_{T_1} von PPIX-DME in reinem EtOD abschätzen zu $k_{T_1}^{\text{max}} = 0,013 \mu\text{s}^{-1}$, entsprechend einer minimalen Triplett- T_1 -Lebensdauer von $\tau_{T_1}^{\text{min}} = 77 \mu\text{s}$. Ebenso liefert die Extrapolation auf $[O_2] = 0$ nach Gleichung (2.15) und (2.17) auf Seite 27/28 aus β_1 die Abklingrate $K_{\Delta} = k_{\Delta} + k_{\Delta S_0} [PPIX] = 0,034 \pm 0,002 \mu\text{s}$. Die Abschätzung von k_{Δ} und $k_{\Delta S_0}$ erfolgt weiter unten.

Wegen $k_{T_1 O_2} - k'_{T_1 O_2} + k_{T_1 \Delta}$ gilt $k_{T_1 \Delta} \leq k_{T_1 O_2}$. Damit läßt sich eine obere Grenze für $k_{T_1 \Delta}$ bestimmen zu $k_{T_1 \Delta}^{\text{max}} = 20 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1} \text{M}^{-1}$. Aus dieser oberen Grenze für $k_{T_1 \Delta}$ läßt sich nun eine untere Grenze für $k_{\Delta T_1}$ festlegen. Dazu sei zunächst die Differenz des y-Achsenabschnitts von β_1 und des Grenzwerts von β_2 für unendlich hohe Sauerstoff-Konzentration unter Verwendung der Gleichungen (2.14), (2.15) und (2.17) auf Seite 27/28 berechnet. Es ergibt sich:

$$\delta := \beta_1([O_2] = 0) - \beta_2([O_2] \rightarrow \infty) = \frac{k_{\Delta T_1} k_{T_1 \Delta}}{k_{T_1 O_2}} [PPIX]_0 \quad (4.3)$$

Aus Abbildung 4.20 ergibt sich $\delta = 0,008 \pm 0,004 \mu\text{s}^{-1}$. Im Grenzfall $k_{T_1 \Delta} = k_{T_1 O_2}$ ergibt sich somit $k_{\Delta T_1} = \frac{\delta}{[PPIX]_0}$ und damit eine untere Grenze für $k_{\Delta T_1}$ zu $k_{\Delta T_1}^{\text{min}} = 0,13 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1} \text{M}^{-1}$.

4.1.5.2 Variation der PPIX-DME-Konzentration

Im Rahmen dieser Experimente wurden PPIX-DME-Konzentrationen in EtOD von $5 \mu\text{M}$ bis $300 \mu\text{M}$ verwendet. Die Sauerstoff-Konzentration betrug $[O_2] = 115 \pm 6 \mu\text{M}$, so daß bei diesen Lösungen die Sauerstoff-Konzentration weit unterhalb derer einer luftgesättigten Lösung lag. Die Sauerstoff-Konzentration wurde analog zu ATMPn so niedrig gewählt, um einen ausreichend langen Anstieg der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz

und somit dessen Meßbarkeit zu gewährleisten. Der Vergleich von Abbildung 4.21 mit Abbildung 4.20 zeigt aber, daß K_{T_1} und K_{Δ} verglichen mit dem Bereich der Sauerstoff-Konzentration, bei dem das *avoided crossing* auftritt, bereits weit auseinander liegen. Abbildung 4.21 zeigt die Anstiegs- und Abklingraten der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz in Abhängigkeit der PPIX-DME-Konzentration.

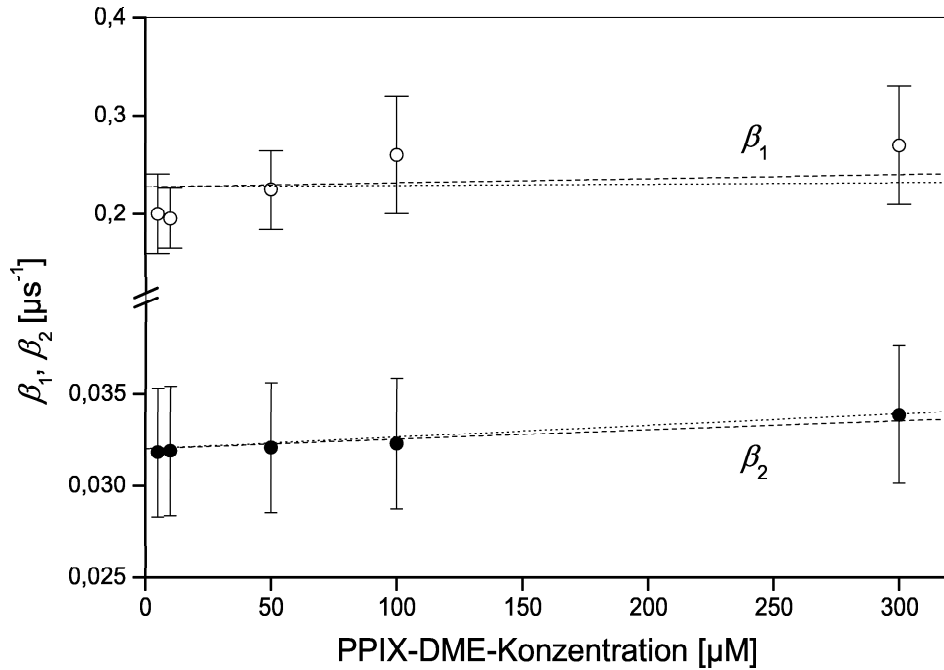


Abbildung 4.21: Anstiegs- (β_1) und Abklingraten (β_2) der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz bei fester Sauerstoff-Konzentration von $115 \pm 6 \mu\text{M}$ und Variation der PPIX-DME-Konzentration

Wie zu erkennen ist, liegen die β_2 innerhalb der Meßfehler auf einer Geraden. Dies ist nach Gleichungen (2.14) und (2.17) auf Seite 27/28 der Fall für $K_{T_1} \gg K_{\Delta}$ und $k_{T_1} \ll k_{T_1 O_2} [O_2]$, denn dann folgt aus Gleichung (2.15) $K_{T_1} \approx k_{T_1 O_2} [O_2]$ und es ergibt sich mit Gleichung (2.18):

$$\begin{aligned} \beta_2 &= k_{\Delta} + \left(k_{\Delta S_0} + k_{\Delta T_1} - \frac{k_{\Delta T_1} k_{T_1 \Delta}}{k_{T_1 O_2}} \right) [PPIX] = \\ &= k_{\Delta} + \left(k_{\Delta S_0} + k_{\Delta T_1} - \frac{\delta}{[PPIX]_0} \right) [PPIX] \quad (4.4) \end{aligned}$$

Aus dem Achsenabschnitt der Fitgeraden von β_2 läßt sich nun k_{Δ} bestimmen zu $k_{\Delta} = 0,032 \pm 0,001 \mu\text{s}^{-1}$. Damit ergibt sich die Lebensdauer des Singulett-Sauerstoffs in reinem EtOD zu $\tau_{\Delta} = 31 \pm 1 \mu\text{s}$. Dieser Wert ist identisch zu demjenigen bei ATPMn und ist in sehr guter Übereinstimmung mit den in [WHR95] angegebenen

Literaturwerten von 29 bis 31 μs . Die Steigung der Fitgeraden liefert $k_{\Delta\text{S}_0} + k_{\Delta\text{T}_1} - \frac{\delta}{[\text{PPIX}]_0} = (0,069 \pm 0,004) \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$. Da $k_{\Delta\text{S}_0} \geq 0$ gelten muß, ergibt sich somit unter Verwendung von $\delta = 0,008 \pm 0,004 \mu\text{s}^{-1}$ (siehe Gleichung (4.2)) eine obere Grenze von $k_{\Delta\text{T}_1}$ zu $k_{\Delta\text{T}_1}^{\text{max}} = 0,47 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$. Unter Verwendung von Gleichung (4.3) läßt sich nun eine untere Grenze von $k_{\text{T}_1\Delta}$ abschätzen zu $k_{\text{T}_1\Delta}^{\text{min}} = 0,5 \cdot 10^9 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$. Unter Verwendung von Gleichung (4.4) läßt sich nun eine obere Grenze für $k_{\Delta\text{S}_0}$ abschätzen zu $k_{\Delta\text{S}_0}^{\text{max}} = 0,34 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$. Jedoch stellt man beim Vergleich der Meßwerte mit den aus den berechneten Grenzen gewonnenen Kurven fest, daß Gleichung (4.4) eine sehr grobe Abschätzung darstellt. Deshalb sind $k_{\text{T}_1\Delta}^{\text{min}}$ sowie $k_{\Delta\text{S}_0}^{\text{max}}$ zu korrigieren. Durch Anpassung der exakt nach Gleichung (4.4) berechneten Kurven an die Meßdaten ergibt sich:

$$\begin{aligned} 0 &\leq k_{\Delta\text{S}_0} \leq 0,08 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1} \\ 15 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1} &\leq k_{\text{T}_1\Delta} \leq 19 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1} \\ 0,13 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1} &\leq k_{\Delta\text{T}_1} \leq 0,47 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1} \end{aligned}$$

Bildet man nun das Verhältnis aus den Mittelwerten von $k_{\Delta\text{T}_1}$ und $k_{\text{T}_1\Delta}$, so ergibt sich $\frac{k_{\Delta\text{T}_1}}{k_{\text{T}_1\Delta}} = 0,017 \pm 0,008$, was in sehr guter Übereinstimmung mit den Erwartungen aus dem Boltzmann-Gesetz liegt, nach dem $\frac{k_{\Delta\text{T}_1}}{k_{\text{T}_1\Delta}} = e^{-\frac{\Delta E}{k_{\text{B}}T}} \approx 0,020$ gilt (s. o.).

4.1.5.3 Variation der Natriumazid-Konzentration

Im Rahmen dieser Experimente wurden Natriumazid-Konzentrationen von 1 μM bis 1000 μM verwendet. Die PPIX-DME-Konzentration betrug $[\text{PPIX}]_0 = 300 \mu\text{M}$, die Sauerstoff-Konzentration in Lösung betrug $[\text{O}_2] = 90 \pm 7 \mu\text{M}$. Abbildung 4.22 auf Seite 102 zeigt die Anstiegs- und Abklingraten der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz in Abhängigkeit der Natriumazid-Konzentration. Hier ist zu bemerken, daß bei einer Natriumazid-Konzentration von $[\text{NaN}_3] = 1000 \mu\text{M}$ der Anstieg der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz zu steil war, um gemäß Gleichung (2.19) auf Seite 28 gefittet zu werden. Deshalb wurde bei dieser Natriumazid-Konzentration lediglich β_2 bestimmt. Wie zu sehen ist, stimmen die Abklingraten β_2 sehr gut mit den berechneten Kurven überein. Aus der Steigung von β_2 für kleine Quencherkonzentrationen läßt sich nach Gleichung (2.15) und (2.17) auf Seite 27/28 die Quenchingratenkonstante $k_{\Delta\text{Q}}$ bestimmen. Es ergibt sich (für $[\text{NaN}_3] < 300 \mu\text{M}$) $k_{\Delta\text{Q}} = (1,4 \pm 0,1) \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$. Dieser Wert liegt etwas niedriger als die in [WHR95] für Ethanol angegebenen Literaturwerte von $2,0 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$ bzw. $2,2 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$.

Jedoch zeigt sich für die Anstiegsraten β_1 der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz, daß die gemessenen Punkte mit steigender Natriumazid-Konzentration stärker anwachsen als die berechneten Kurven (Abbildung 4.22), was eine Bestimmung der Ratenkonstante $k_{\text{T}_1\text{Q}}$ vereitelt. Dieses Verhalten wurde bereits beim Photosensibilisator Photofrin

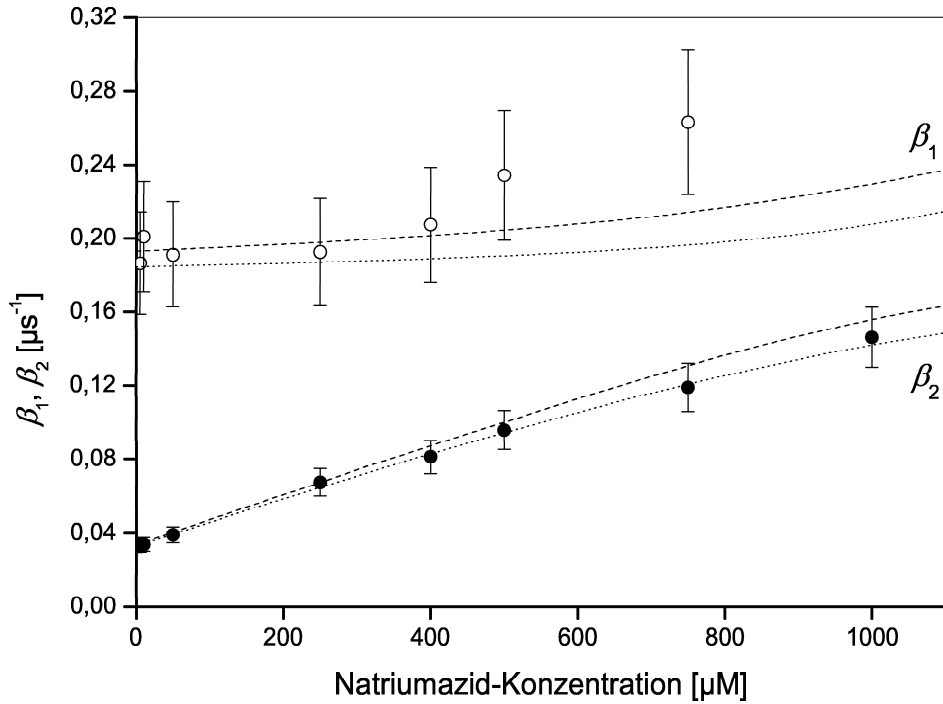


Abbildung 4.22: Anstiegs- (β_1) und Abklingraten (β_2) der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz bei fester Sauerstoff-Konzentration von $90 \pm 7 \mu\text{M}$, fester PPIX-DME-Konzentration von $300 \mu\text{M}$ und Variation der Natriumazid-Konzentration

beobachtet [KMS01] und durch die Tatsache, daß es sich dabei um ein Substanzgemisch von Oligomeren verschiedener Porphyrine, darunter PPIX, handelt, versucht zu erklären. Im Gegensatz dazu handelt es sich bei PPIX-DME um eine Reinsubstanz, dennoch tritt dieses stärkere Anwachsen der β_1 auf. Einen möglichen Erklärungsansatz bietet die Tatsache, daß zumindest in wässrigen Lösungen das Aggregationsverhalten von PPIX-DME vom pH-Wert beeinflusst wird [SCR02], welcher sich aber in diesen durch die Zugabe von Natriumazid verändert. Hätte Natriumazid somit auch in EtOD einen Einfluß auf das Aggregationsverhalten, so wäre durch diesen zusätzlichen Effekt durchaus ein überproportionales Anwachsen der Triplett- T_1 -Relaxationsrate K_{T_1} mit der Natriumazid-Konzentration denkbar und damit gemäß Gleichungen (2.14), (2.15) und (2.17) auf Seite 27/28 auch ein stärkeres Ansteigen der β_1 möglich. Dies wäre jedoch noch experimentell zu überprüfen.

4.1.5.4 Quantenausbeute

Da für PPIX-DME die Ratenkonstante $k_{T_1\Delta}$ abgeschätzt wurde, kann nun mit Hilfe von Gleichung (2.29) auf Seite 31 eine Abschätzung der Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute Φ_Δ in EtOD in Abhängigkeit der Sauerstoff-Konzentration erfolgen. Mit $k_{T_1\Delta} = (17 \pm 2) \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$ und der Verwendung der gemessenen Anstiegsraten β_1 ergibt sich mit $\Phi_{T_1} = 0,8$ (für Benzol, [PT86]) die in Abbildung 4.23 dargestellte Abhängigkeit der Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute von PPIX-DME in EtOD in Abhängigkeit der Sauerstoff-Konzentration. Die durchgezogene Linie repräsentiert dabei eine Fitkurve gemäß Gleichung (2.33) auf Seite 32 und (2.17) auf Seite 27, bei welcher die Mittelwerte der bereits bestimmten Raten und Ratenkonstanten verwendet wurden und mit Hilfe derer $k_{T_1} + k_{T_1S_0}[PPIX] = 0,022 \pm 0,003 \text{ }\mu\text{s}^{-1}$ bestimmt wurde. Wie zu erkennen ist, beträgt die Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute Φ_Δ in Ethanol bei Betrachtung des für die PDT *in vivo* relevanten Bereichs der Sauerstoff-Konzentration unter $50 \text{ }\mu\text{M}$ etwas weniger als 0,6, wobei wieder anzumerken ist, daß *in vivo* die exakte Abhängigkeit von Φ_Δ von der Sauerstoff-Konzentration anders als in EtOD sein dürfte.

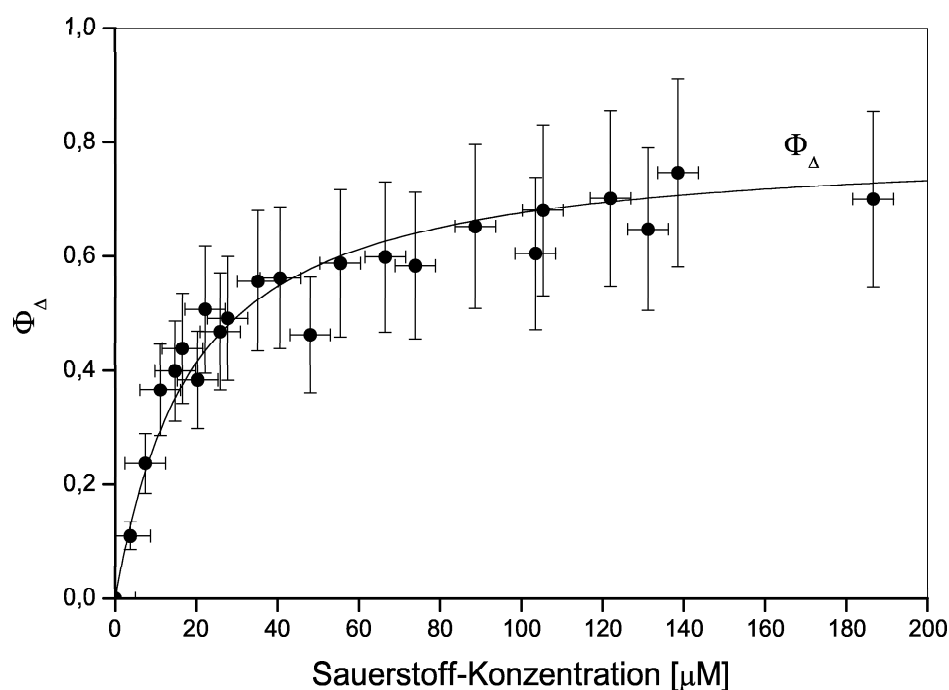


Abbildung 4.23: Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute von PPIX-DME in Abhängigkeit der Sauerstoff-Konzentration

Zusammenfassend seien in Tabelle 4.6 nochmals alle mit PPIX-DME experimentell bestimmten Relaxationsraten und -konstanten mit den zugehörigen Literaturwerten (soweit vorhanden) aufgeführt.

Rate/ Ratenkonstante	experimenteller Wert	Literaturwert
$k_{T_1} [\mu s^{-1}]$	$< 0,013$	–
$\tau_{T_1} [\mu s]$	> 77	–
$k_{T_1O_2} [s^{-1}M^{-1}]$	$(19 \pm 1) \cdot 10^8$	–
$k_{T_1\Delta} [s^{-1}M^{-1}]$	$15 \cdot 10^8 \leq k_{T_1\Delta} \leq 19 \cdot 10^8$	–
$k_{T_1S_0} [s^{-1}M^{-1}]$	–	–
$k_{T_1Q} [s^{-1}M^{-1}] (NaN_3)$	–	–
$k_{\Delta} [\mu s^{-1}]$	$0,032 \pm 0,002$	0,032 - 0,034 [WHR95]
$\tau_{\Delta} [\mu s]$	31 ± 2	29 - 31 [WHR95]
$k_{\Delta S_0} [s^{-1}M^{-1}]$	$0 \leq k_{\Delta S_0} \leq 0,08 \cdot 10^8$	–
$k_{\Delta T_1} [s^{-1}M^{-1}]$	$0,13 \cdot 10^8 \leq k_{\Delta T_1} \leq 0,47 \cdot 10^8$	–
$k_{\Delta Q} [s^{-1}M^{-1}] (NaN_3)$	$(1,4 \pm 0,1) \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^8, 2,2 \cdot 10^8$ ¹ [WHR95]

Tabelle 4.6: Vergleich der experimentell bestimmten Relaxationsraten und -konstanten des Photosensibilisators PPIX-DME sowie des Singulett-Sauerstoffs in EtOD mit Literaturwerten; Lösungsmittel:
¹: Ethanol

Beim Vergleich der experimentellen Ergebnisse der bisher diskutierten Photosensibilisatoren (siehe auch Tabelle 4.5 auf Seite 97) läßt sich für die Ratenkonstante $k_{T_1O_2}$ der Sauerstoff-induzierten Triplett- T_1 -Deaktivierung des jeweiligen Photosensibilisators durch Sauerstoff die Aussage treffen, daß diese mit zunehmendem Unterschied zwischen der energetischen Lage des T_1 -Zustandes des Photosensibilisators und der des $^1\Delta_g$ -Zustandes des Sauerstoffs abnimmt. Gleiches gilt für die Ratenkonstante $k_{T_1\Delta}$, die aber lediglich für die beiden Photosensibilisatoren Bengalrosa und PPIX-DME in EtOD abgeschätzt werden konnte. Zumindest letzteres entspricht auch den Erwartungen, da mit abnehmendem energetischen Unterschied zwischen den beiden energetischen Niveaus weniger überschüssige Energie thermalisiert werden muß.

4.1.6 Indocyaningrün

ICG-NaI wurde in Konzentrationen von 2 μM bis zu 1 mM sowohl in D_2O , DMSO, wie auch in $\text{D}_2\text{O} + 50 \frac{\text{g}}{\text{l}}$ humanes Serumalbumin gelöst. Die Sauerstoff-Konzentration wurde in D_2O zwischen 9 μM und 780 μM variiert. Bei Verwendung von DMSO und $\text{D}_2\text{O} + 50 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ humanes Serumalbumin als Lösungsmittel wurden sowohl luftgesättigte Lösungen verwendet wie auch Lösungen, die mit gasförmigem Stickstoff bzw. Sauerstoff gewaschen wurden, wobei in diesen Lösungen die Sauerstoff-Konzentration mit den zur Verfügung stehenden Meßgeräten nicht bestimmt werden kann. Die Laserpulsenergie wurde zwischen 3 μJ und 120 μJ variiert. Bei allen Experimenten konnte zwar eine Lumineszenz bei 1270 nm gemessen werden, jedoch reagierten die Meßsignale weder in der zu erwartenden Weise auf eine Veränderung der Sauerstoff-Konzentration in Lösung, d. h. durch eine Erhöhung des Lumineszenzsignals bei Erhöhung der Sauerstoff-Konzentration und umgekehrt, noch auf die Zugabe von Natriumazid durch eine Verkürzung der Lumineszenz-Abklingzeit bei gleichzeitiger Erniedrigung der Lumineszenzintensität. Somit ist gezeigt, daß es sich bei den gemessenen Lumineszenz-Signalen um eine Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz handelt.

Abbildung 4.24 auf Seite 106 zeigt exemplarisch vier Meßsignale generiert durch ICG-NaI in D_2O . Die mittlere Laserleistung wurde zu 200 mW und eine Wellenlänge von 790 nm gewählt. Wie zu erkennen ist, zeigt das gemessene Signal bei Erhöhung der ICG-NaI-Konzentration von 10 μM (a) auf 200 μM (b) keine Veränderung. Variiert man jedoch beispielsweise bei einer ICG-NaI-Konzentration von 10 μM die Sauerstoff-Konzentration von 220 μM bei Luftsättigung auf 9 μM (c) bzw. auf 781 μM (d), so zeigt in beiden Fällen das gemessene Signal die gleiche Veränderung, nämlich daß ein Signalaufbau nicht mehr zu beobachten ist. Desweiteren unterscheidet sich die gemessene Signalthöhe bei einer Sauerstoff-Konzentration von 781 μM (d) kaum von der bei 9 μM (c), was bei einer Beteiligung von Singulett-Sauerstoff an den gemessenen Signalen durchaus zu erwarten wäre.

Ein weiteres Indiz, welches gegen eine Beteiligung der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz an den gemessenen Signalen spricht, ist deren Verhalten bei Zugabe von Natriumazid. Abbildung 4.25 auf Seite 106 zeigt die gemessenen Lumineszenzsignale bei Bestrahlung von 200 μM NaI in D_2O ohne Natriumazid (a) und bei Zugabe von 10 mM Natriumazid (b). Wie zu erkennen ist, sind die Meßsignale nahezu identisch, so daß zumindest in D_2O die Messung der Lumineszenz von Singulett-Sauerstoff generiert durch photoaktiviertes ICG-NaI ausgeschlossen werden kann. Bei allen bisher gezeigten, durch Laserbestrahlung von ICG-NaI generierten Lumineszenzsignalen beträgt die Abklingzeit $4 \pm 1 \mu\text{s}$.

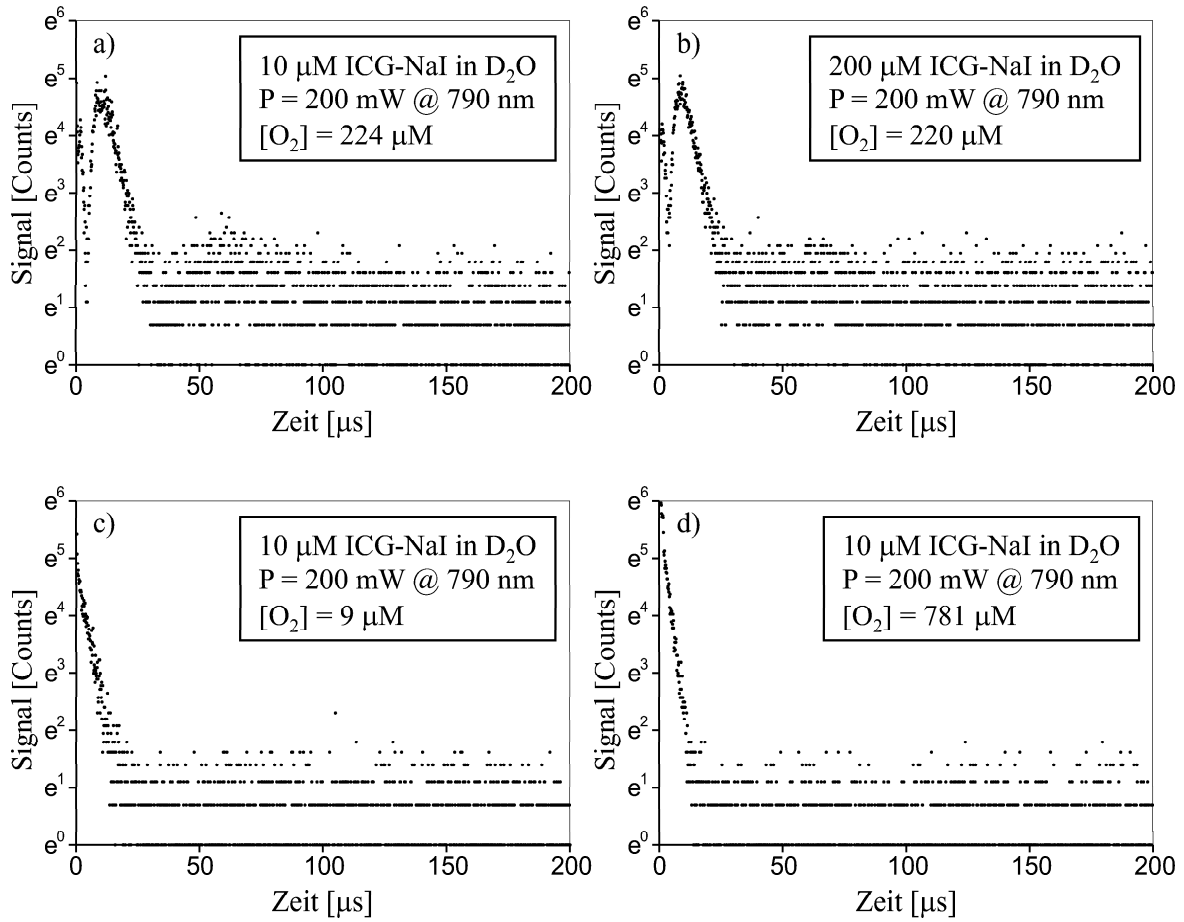


Abbildung 4.24: Exemplarische Meßsignale generiert durch ICG-NaI in D₂O bei Variation der ICG-NaI- und der Sauerstoff-Konzentration

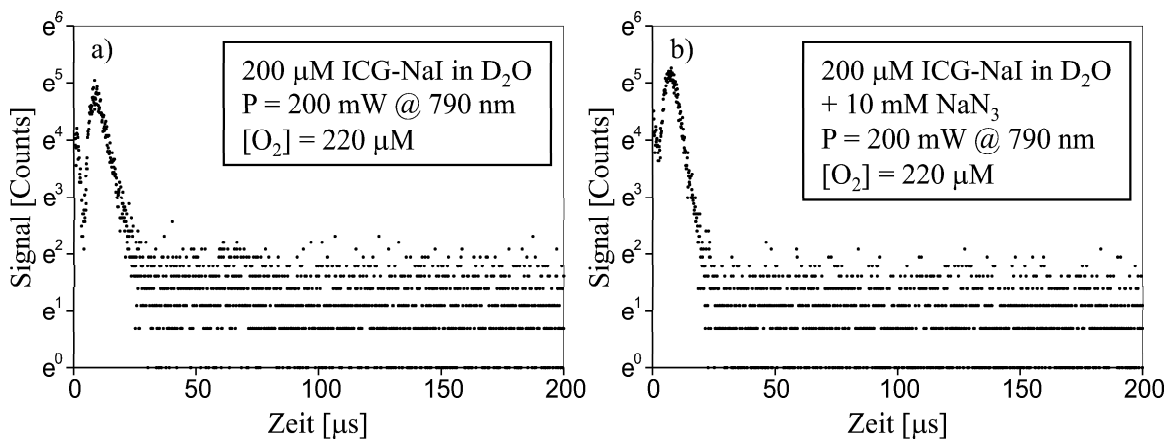


Abbildung 4.25: Exemplarische Meßsignale generiert durch ICG-NaI in D₂O ohne und mit Zugabe von Natriumazid

Bei Verwendung von Natriumazid in DMSO bleibt, analog zu D_2O , das zeitliche Verhalten des gemessenen Signals unbeeinflusst. Bei Veränderung der Sauerstoff-Konzentration in DMSO ist der zeitliche Anstieg des Meßsignals immer zu beobachten. Abbildung 4.26 zeigt die gemessenen Lumineszenzsignale bei Bestrahlung von $2\text{ }\mu\text{M}$ ICG-NaI in DMSO bei Luftsättigung ohne Zugabe von Natriumazid (a) und bei Zugabe von 10 mM Natriumazid (b). Desweiteren gezeigt sind Lumineszenzsignale bei Bestrahlung von $2\text{ }\mu\text{M}$ ICG-NaI in DMSO bei einer verglichen mit der Luftsättigungskonzentration sehr kleinen Sauerstoff-Konzentration (c) und bei einer verglichen mit der Luftsättigungskonzentration sehr großen Sauerstoff-Konzentration (d). Bei letzterem ist zu sehen, daß die Signalthöhe kleiner ist als bei Luftsättigung, wohingegen sich die Abklingzeit von $4 \pm 1\text{ }\mu\text{s}$ auf etwa $8\text{ }\mu\text{s}$ erhöht.

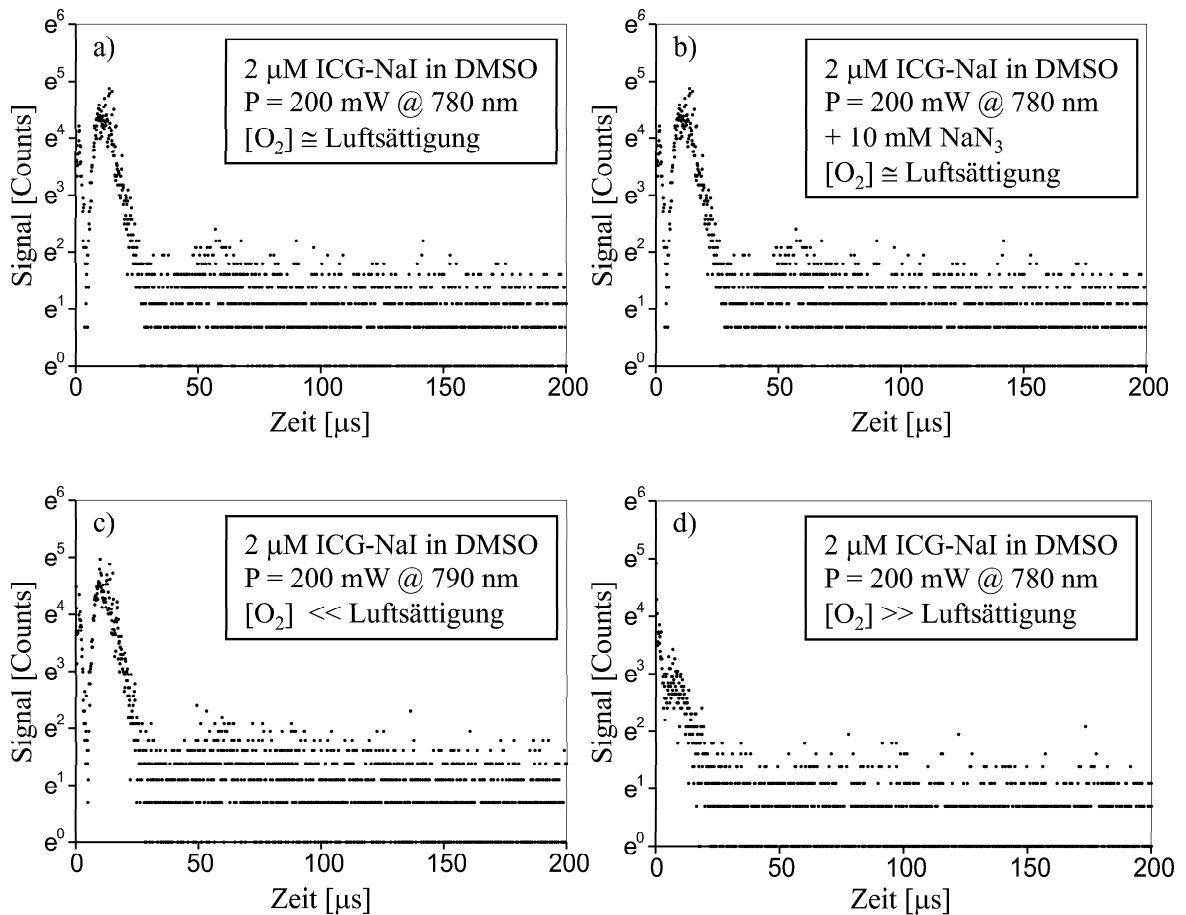


Abbildung 4.26: Exemplarische Meßsignale generiert durch ICG-NaI in DMSO mit und ohne Zugabe von Natriumazid und bei Variation der Sauerstoff-Konzentration

Diese verglichen mit der Luftsättigungskonzentration veränderten Sauerstoff-Konzentrationen wurden durch Waschen der Lösungen für 5 Minuten mit Stickstoff (c) bzw. für 10 Minuten mit Sauerstoff (d) erhalten. Jedoch können keine genaueren

Angaben zur Sauerstoff-Konzentration in Lösung gemacht werden, da die beiden zur Verfügung stehenden Meßsensoren zur Bestimmung der Sauerstoff-Konzentration in Lösung nicht für DMSO als Lösungsmittel geeignet sind.

An dieser Stelle sei abschließend zu den Meßergebnissen mit ICG-NaI noch bemerkt, daß ICG-NaI ebenfalls in Lösungen von $50 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ Serumalbumin in D_2O gelöst wurde. Die Meßsignale waren zu denen generiert durch ICG-NaI in DMSO nahezu identisch und veränderten sich bei Zugabe von Natriumazid bzw. bei Variation der Sauerstoff-Konzentration nicht. Somit konnte also in keinem der verwendeten Lösungsmittel eine Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz nachgewiesen werden.

Ein Ansatz zur Begründung, weshalb ICG-NaI in Zellkulturexperimenten als Typ II-Photosensibilisator angegeben wurde [FSB97, BAK99], jedoch keine Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz nachweisbar ist, wurde durch chromatographische und massenspektrometrische Untersuchungen von bestrahltem und unbestrahltem ICG-NaI geliefert. Es zeigte sich, daß sich bei Bestrahlung von in Wasser wie auch in DMSO gelöstem ICG-NaI (20 Pulse mit einer Pulsenergie von 2,6 J und einer Wellenlänge von 805 nm) sechs Produkte bilden, von denen eines eine molekulare Masse besitzt, die gleich der Summe der molekularen Masse des ICG-Na-Moleküls und der des Sauerstoffmoleküls ist. Von den verbleibenden fünf Produkten lassen sich desweiteren jeweils aus zwei insgesamt zwei Paare bilden, deren molekulare Masse gleich der Summe der molekularen Masse eines ICG-Na-Moleküls und der eines Sauerstoffmoleküls ist. Diese Produktbildung läßt sich durch Zugabe von Natriumazid verhindern (siehe Abbildung 4.27).

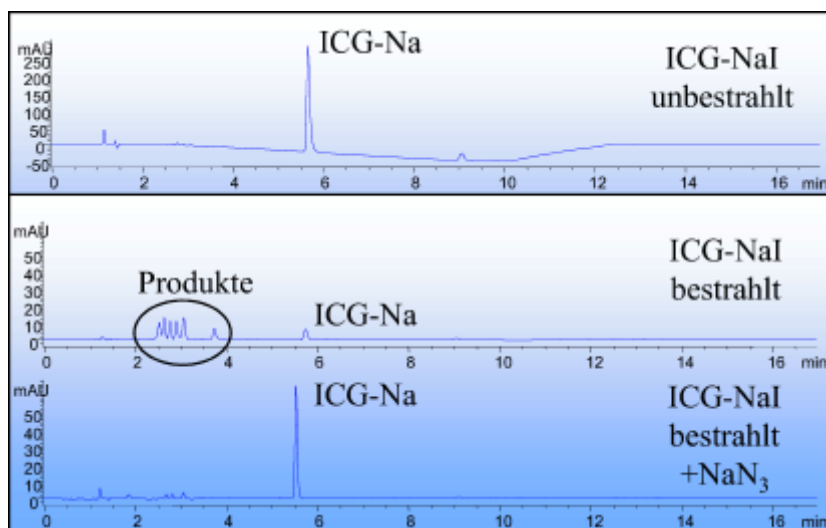


Abbildung 4.27: Chromatogramme von ICG-NaI, aufgenommen mit dem high pressure liquid chromatography (HPLC)-Verfahren, unbestrahlt und bestrahlt, sowie bestrahlt mit Zugabe von Natriumazid (NaN_3) [S03]

Der vorgeschlagene Mechanismus ist hier also zunächst eine selbstsensibilisierte Photooxidation, bei welcher der durch die Laserbestrahlung von ICG-Na erzeugte Singulett-Sauerstoff an das ICG-Na-Molekül bindet. Aufgrund des verglichen mit der Ausgangssubstanz veränderten UV-Spektrums der gebildeten Produkte kann die Aussage getroffen werden, daß durch die Oxidation des ICG-Na-Moleküls dessen Chromophor, welches die Polymethinkette ist, zerstört wird [V02]. Dies bedeutet also, daß im Rahmen der Oxidation eine sog. Dioxethangruppe an der Polymethinkette des ICG-Na-Moleküls gebildet wird, wobei zu beachten ist, daß diese Dioxethanverbindungen thermisch instabil sind, so daß das oxidierte ICG-Na-Molekül zu Carbonylverbindungen fragmentieren kann [V02]. In Zellkulturversuchen erwiesen sich die durch die selbstsensibilisierte Photooxidation gebildeten Produkte des ICG-Na-Moleküls als zelltoxisch. Der Mechanismus der Phototoxizität von ICG-NaI ist also weder ein reiner Typ I- noch ein reiner Typ II-Mechanismus, sondern eine bisher noch nicht beschriebene Typ II-induzierte photodynamische Reaktion.

4.2 Lumineszenz von Singulett-Sauerstoff in Lipidsuspensionen

Im folgenden werden nun die Meßergebnisse der Anstiegs- und Abklingzeiten der Lumineszenz von Singulett-Sauerstoff, generiert durch Photofrin in Suspensionen von $15 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ Phosphatidylcholin, vorgestellt und diskutiert. Aufgrund der guten Löslichkeit von Photofrin in wäßrigen Lösungen gepaart mit seiner ebenfalls vorhandenen lipophilen Eigenschaft, sowie dem Vorhandensein von Sauerstoff sowohl in wäßriger wie auch in der Lipidumgebung wird Singulett-Sauerstoff sowohl im Lösungsmittel ($\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$) wie auch in Phosphatidylcholin generiert. Jedoch kann weder eine Aussage über die Sauerstoff-Konzentration noch über die Photofrin-Konzentration in beiden Umgebungen gemacht werden. Letztere kann nur als Einwaage pro Volumen Suspension angegeben werden, also ohne Beachtung der Verteilung zwischen beiden Umgebungen. Gleiches gilt für die Konzentration eines zugegebenen Quenchers. Aus diesem Grund werden in den folgenden Abbildungen auch Abklingzeiten und nicht -raten angegeben, da eine Bestimmung von Ratenkonstanten durch Variation der Konzentration eines der gelösten Stoffe nicht möglich ist.

Außerdem gelten für die Konzentration an Triplett- T_1 -Zuständen von Photofrin und an Singulett-Sauerstoff für jede Umgebung getrennt Gleichungen (2.11) bis (2.16) auf Seite 26-28. Vernachlässigt man nun die Möglichkeit der Diffusion des Singulett-Sauerstoffs innerhalb seiner Lebensdauer in die jeweils andere Umgebung in Bezug auf seine Entstehung, so ist die Gesamtzahl an Singulett-Sauerstoff-Molekülen in der Suspension gleich der Summe der Konzentrationen in der jeweiligen Umgebung, gewichtet mit den zugehörigen Volumenanteilen. Somit gilt für die zu erwartende Lumineszenzleistung nach Gleichung (2.9) auf Seite 25 und (2.19) auf Seite 28:

$$P_L^{1267}(t) \propto A \cdot [^1\text{O}_2]^{\text{Lip}}(t) + B \cdot [^1\text{O}_2]^{\text{W}}(t) =$$

$$= A \frac{[T_1]_0^{\text{Lip}} k_{\text{T}\Delta}^{\text{Lip}} [\text{O}_2]^{\text{Lip}}}{\beta_1^{\text{Lip}} - \beta_2^{\text{Lip}}} \left(e^{-\beta_2^{\text{Lip}} t} - e^{-\beta_1^{\text{Lip}} t} \right) + B \frac{[T_1]_0^{\text{W}} k_{\text{T}\Delta}^{\text{W}} [\text{O}_2]^{\text{W}}}{\beta_1^{\text{W}} - \beta_2^{\text{W}}} \left(e^{-\beta_2^{\text{W}} t} - e^{-\beta_1^{\text{W}} t} \right) \quad (4.5)$$

Dies bedeutet, daß aufgrund der beiden unterschiedlichen mikroskopischen Umgebungen zwei unterschiedliche, den jeweiligen Umgebungen entsprechende Anstiegs- und Abklingzeiten zu erwarten sind, wobei näherungsweise $k_{\text{T}\Delta}^{\text{Lip}} = k_{\text{T}\Delta}^{\text{W}} =: k_{\text{T}\Delta}$ und $\beta_1^{\text{Lip}} = \beta_1^{\text{W}} =: \beta_1$ gesetzt wird. Jedoch werden trotzdem zwei verschiedene Abklingzeiten erwartet.

Abbildung 4.28 auf Seite 111 zeigt zwei exemplarische Einzelmessungen der Lumineszenz von Singulett-Sauerstoff, generiert durch Bestrahlung von $50 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Photofrin in Suspensionen von $15 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ Phosphatidylcholin in D_2O (a) und H_2O (b). Wie in Abbildung 4.28 (a) zu sehen ist, sind in D_2O durchaus mindestens zwei verschiedene Steigungen des Abfalls erkennbar. Die Bestimmung der Abklingzeiten erfolgte bei Lipidsuspensionen analog zu den homogenen Lösungen. Durch einen bi-exponentiellen Fit ergeben sich Abklingzeiten von $14 \pm 2 \mu\text{s}$ und $55 \pm 5 \mu\text{s}$. Letztere ist gleich der Lebensdauer

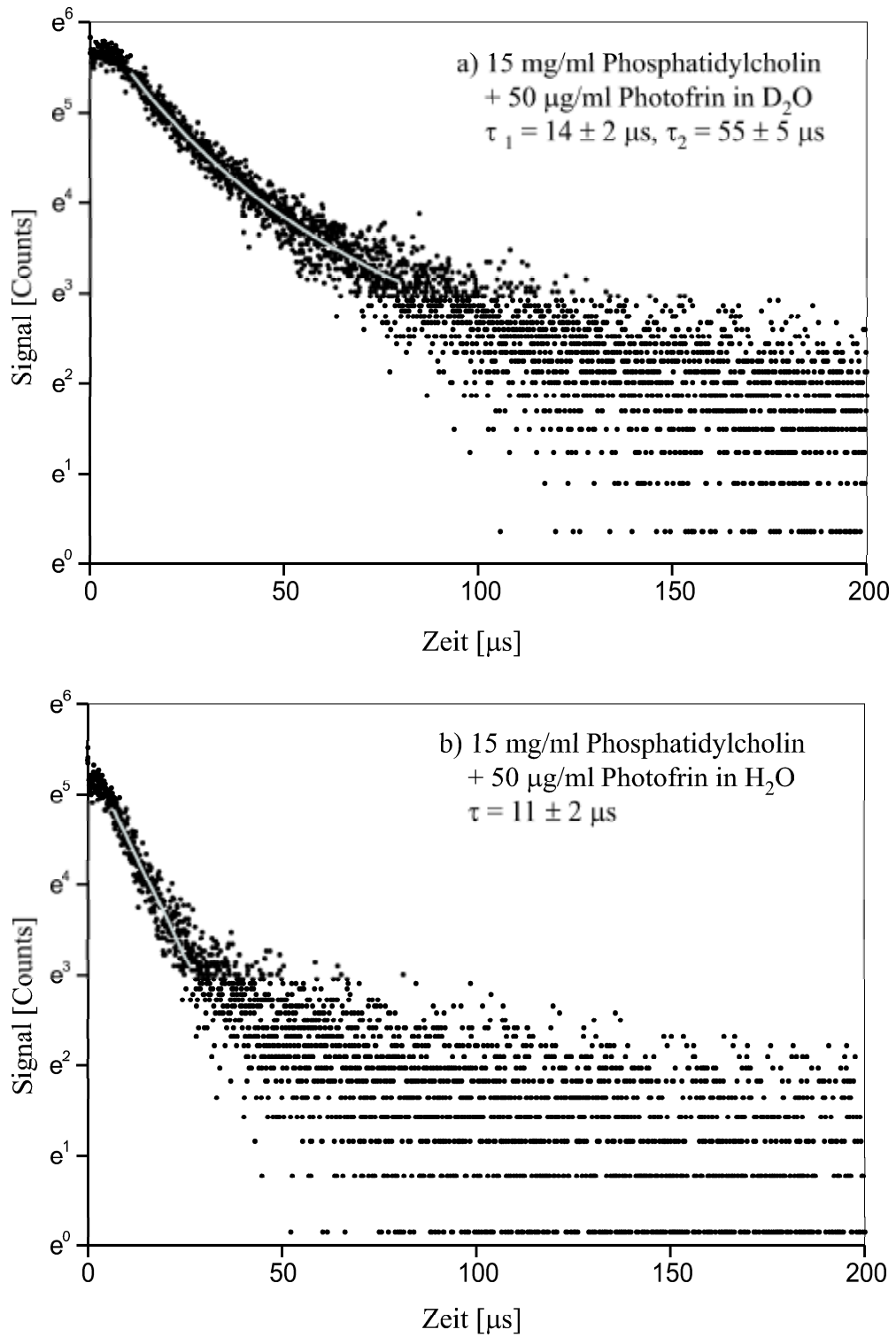


Abbildung 4.28: Exemplarische zeitaufgelöste Einzelmessungen der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz in Lipidsuspensionen: a) D_2O , b) H_2O ; Die durchgezogenen Linien repräsentieren die Fitkurven

des Singulett-Sauerstoffs in einer homogenen Lösung von $200 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Photofrin in D_2O [KMS01], somit handelt es sich bei ersterer um dessen Lebensdauer in Phosphatidylcholin. Diese wurde bereits unter Verwendung von Liposomen zu etwa $12 \mu\text{s}$ abgeschätzt [EAF98], was im Rahmen des experimentellen Fehlers identisch ist mit der aus Abbildung 4.28 (a) bestimmten. Jedoch ist das in Abbildung 4.28 (b) gezeigte Lumineszenzabklingverhalten bei Verwendung von H_2O innerhalb der durch das experimentelle Rauschen bestimmten Meßgenauigkeit mono-exponentiell mit einer Abklingzeit von $11 \pm 2 \mu\text{s}$. Bei genauerer Betrachtung von Gleichung (4.5) ist auch zu erkennen, wann bei zwei verschiedenen mikroskopischen Umgebungen mit zwei verschiedenen Singulett-Sauerstoff-Lebensdauern lediglich eine Abklingzeit bestimmt werden kann. Zum einen ist das Maximum der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz in einer Umgebung umgekehrt proportional zur Abklingrate der Lumineszenz. Damit darf also, um ein bestimmtes Signal/Rausch-Verhältnis zu erhalten, die Abklingrate des Singulett-Sauerstoffs in dieser Umgebung nicht zu groß sein. Zum anderen ist für den Beitrag einer bestimmten Signalkomponente zur gesamten Lumineszenz die Konzentrationsverteilung von Photofrin und Sauerstoff und damit auch von Singulett-Sauerstoff (in Gleichung (4.5) durch A und B angedeutet) zwischen beiden Umgebungen von Bedeutung. Benutzt man nun beispielsweise für β_1 in Gleichung (4.5) den Wert in luftgesättigter D_2O -Lösung, $\beta_1 = 0,3 \mu\text{s}^{-1}$ [KMS01], sowie $\beta_2^{\text{Lip}} = 0,08 \mu\text{s}^{-1}$ [EAF98] und $\beta_2^{\text{W}} = 0,3 \mu\text{s}^{-1}$ [WHR95], so dürfte also in Suspensionen von $15 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ Phosphatidylcholin in H_2O (Abbildung 4.28 (b)) $B \ll A$ gelten, da kein bi-exponentielles Verhalten des Lumineszenzabklingens beobachtet werden kann.

4.2.1 Variation der Photofrin-Konzentration

Hierzu wurde die Standardkonzentration von $15 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ Phosphatidylcholin in D_2O bzw. in H_2O verwendet. Die Photofrin-Konzentration in Suspension wurde von $1 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ bis zu $1000 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ variiert. Abbildung 4.29 zeigt die Abklingzeiten der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz in Suspensionen von $15 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ Phosphatidylcholin in D_2O bei Variation der Photofrin-Konzentration.

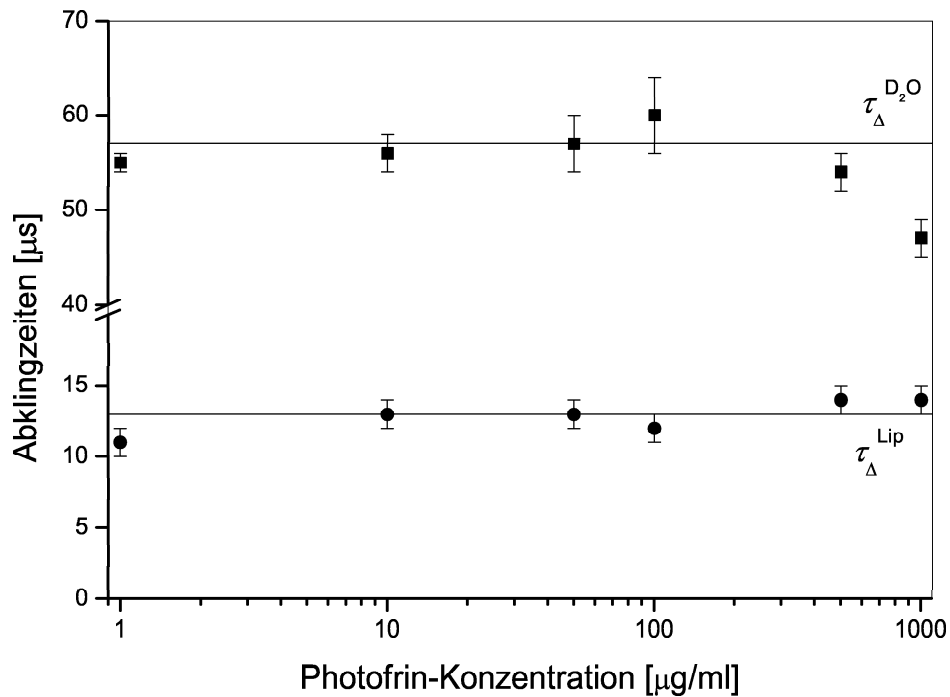


Abbildung 4.29: Abklingzeiten der bi-exponentiell abfallenden Lumineszenz von Singulett-Sauerstoff bei Variation der Photofrin-Konzentration in Suspensionen von Phosphatidylcholin in D_2O

Nach Abbildung 4.29 ist die Abklingzeit des Singulett-Sauerstoffs in Phosphatidylcholin mit $\tau_{\Delta}^{\text{Lip}} = 13 \pm 1 \mu\text{s}$ unabhängig von der Photofrin-Konzentration in der Suspension. Die Abklingzeit des Singulett-Sauerstoffs in D_2O scheint zumindest bis zu einer Photofrin-Konzentration von $100 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ in der Suspension innerhalb des experimentellen Fehlers mit $\tau_{\Delta}^{\text{D}_2\text{O}} = 57 \pm 2 \mu\text{s}$ konstant zu bleiben, erst ab höheren Photofrin-Konzentrationen wird die Abklingzeit meßbar erniedrigt, was sich durch die geringe Quenchingratenkonstante des Photofrins von $(2,5 \pm 0,3) \cdot 10^{-5} \mu\text{s}^{-1} \frac{\text{ml}}{\mu\text{g}}$ [KMS01] erklären läßt. Jedoch bezeichnet die Angabe der Photofrin-Konzentration – dies gilt für alle Lipidsuspensionsmessungen – die Einwaage an Photofrin pro Volumen Suspen-

sion. Hierbei ist die Verteilung zwischen Lipidtröpfchen und wässriger Phase und damit die Konzentrationen an Photofrin in Phosphatidylcholin und in D_2O unbekannt. Aus diesem Grund lassen sich aus einer eventuell vorhandenen Steigung der Relaxationsraten keine Relaxationsratenkonstanten bestimmen. Die Konstanz der Abklingzeit des Singulett-Sauerstoffs in Phosphatidylcholin läßt sich erklären, indem man bereits bei der kleinsten Photofrin-Konzentration in Suspension eine Sättigung der Lipidtröpfchen an Photofrin annimmt.

Abbildung 4.30 zeigt die Abklingzeit des mono-exponentiellen Abfalls der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz in Suspensionen von $15 \frac{mg}{ml}$ Phosphatidylcholin in H_2O bei Variation der Photofrin-Konzentration.

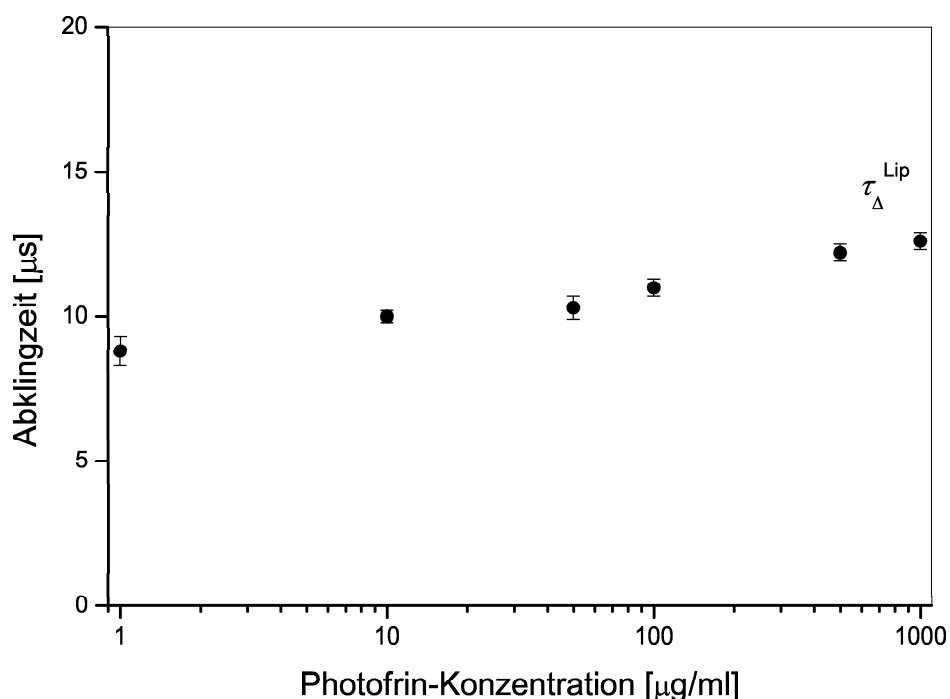


Abbildung 4.30: Abklingzeit des mono-exponentiellen Abfalls der der Lumineszenz von Singulett-Sauerstoff bei Variation der Photofrin-Konzentration in Suspensionen von Phosphatidylcholin in H_2O

Wie bereits diskutiert, handelt es sich bei den bestimmten Abklingzeiten der Lumineszenz des Singulett-Sauerstoffs mit einem Wert von 9 bis $12 \mu s$ um die Lebensdauer des Singulett-Sauerstoffs in Phosphatidylcholin. Hier ist besonderes Augenmerk auf die steigende Tendenz der Abklingzeiten mit steigender Photofrin-Konzentration zu richten. Dieses Verhalten ist entgegengesetzt zu den Erwartungen, denn betrachtet man Photofrin als einen Quencher des Singulett-Sauerstoffs, so müsste dessen Abklingzeit mit steigender Photofrin-Konzentration abnehmen. Möglicherweise handelt es sich

hier auch um einen Effekt eines nicht beachteten systematischen Fehlers. Genauere Schlußfolgerungen sind nicht möglich. Außerdem ist noch zu bemerken, daß es bei keiner Photofrin-Konzentration möglich war, die Lebensdauer des Singulett-Sauerstoffs in H_2O zu bestimmen. Die Gründe hierzu sind dieselben wie sie bereits bei der Diskussion um Abbildung 4.28 (b) genannt wurden.

4.2.2 Quencherexperimente

Im Rahmen dieser Experimente wurde wieder die Standardkonzentration von $15 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ Phosphatidylcholin in D_2O bzw. in H_2O verwendet. Die Photofrin-Konzentration in Suspension wurde zu $50 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ gewählt. Falls nicht explizit anders erwähnt, betrug die Wartezeit zwischen der Zugabe der Quencher und der Laserbestrahlung der Suspension eine Minute.

4.2.2.1 Variation der Natriumazid-Konzentration

Abbildung 4.31 auf Seite 116 zeigt die gemessenen Abklingzeiten der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz bei Zugabe von Natriumazid in verschiedenen Konzentrationen zu den Lipidsuspensionen in D_2O . Wie zu erkennen ist, konnte lediglich bei der niedrigsten Natriumazid-Konzentration von 0,1 mM durch einen bi-exponentiellen Fit des Lumineszenzabklingens sowohl die Abklingzeit des Singulett-Sauerstoffs in Phosphatidylcholin ($12 \pm 1 \mu\text{s}$) als auch die Abklingzeit des Singulett-Sauerstoffs in D_2O ($30 \pm 9 \mu\text{s}$; berechneter Wert in einer Lösung von 0,1 mM Natriumazid in D_2O : $25 \mu\text{s}$) bestimmt werden. Bei größeren Natriumazid-Konzentrationen war der Beitrag des Singulett-Sauerstoffs in D_2O zur gesamten Lumineszenz zu klein, um innerhalb der Meßgenauigkeit ein bi-exponentielles Abklingen zu erhalten (bei einer Natriumazid-Konzentration von 1 mM wäre die Singulett-Sauerstoff-Abklingdauer in reinem D_2O lediglich nur noch $4 \mu\text{s}$). Die Abklingzeit des Singulett-Sauerstoffs in Phosphatidylcholin ist bei einer Natriumazid-Konzentration von 0,1 mM mit $12 \pm 1 \mu\text{s}$ identisch mit der Abklingzeit in Phosphatidylcholin bestimmt durch die Variation der Photofrin-Konzentration. Ab einer Natriumazid-Konzentration von 1 mM ist die Abklingzeit des Singulett-Sauerstoffs konstant auf $7 \pm 2 \mu\text{s}$ reduziert. Eine mögliche Erklärung hierzu wäre durch die Annahme einer sehr geringen Löslichkeit von Natriumazid in Phosphatidylcholin gegeben, so daß bei einer Natriumazid-Konzentration in Suspension von 0,1 mM zwar Natriumazid in die Lipidtröpfchen eindringt, jedoch nicht in genügender Konzentration vorhanden ist, um in Rahmen der experimentellen Genauigkeit eine Verkürzung der Singulett-Sauerstoff-Abklingzeit zu bewirken, jedoch ab der Konzentration von 1 mM Natriumazid in Suspension die Lipidtröpfchen bereits gesättigt an Natriumazid sind (bei Annahme einer Natriumazid-Konzentration von 0,2 mM wäre z.B. die berechnete Abklingzeit des Singulett-Sauerstoffs in Phosphatidylcholin etwa $7 \mu\text{s}$).

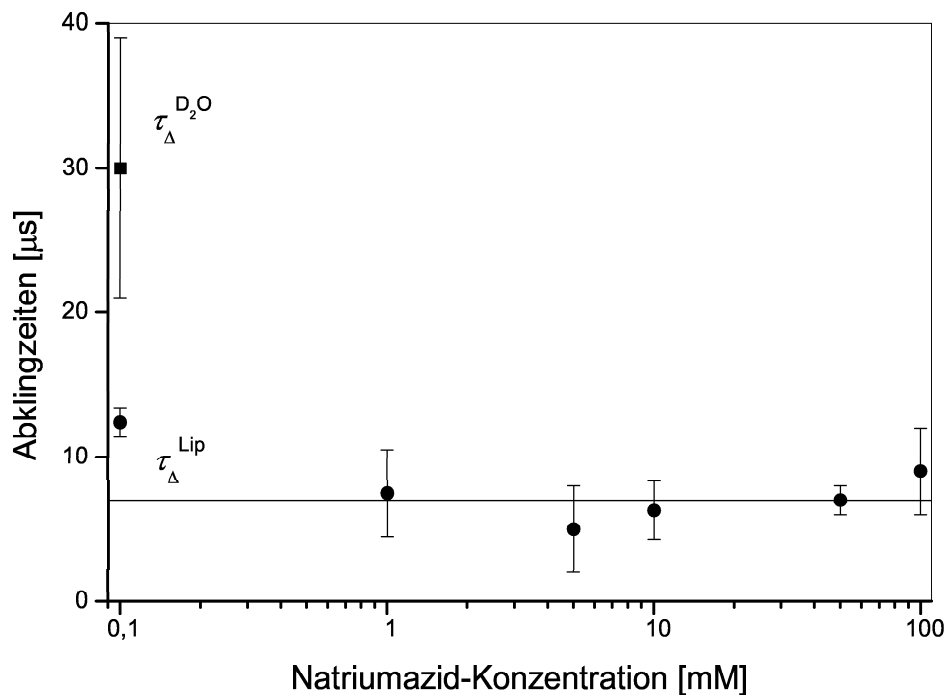


Abbildung 4.31: Abklingzeiten der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz bei Variation der Natriumazid-Konzentration in Suspensionen von Phosphatidylcholin in D_2O mit $50 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Photofrin

Abbildung 4.32 auf Seite 117 zeigt die gemessenen Abklingzeiten der Lumineszenz von Singulett-Sauerstoff bei Zugabe von Natriumazid in verschiedenen Konzentrationen zu den Lipidsuspensionen in H_2O . Auch hier konnte wie bei den Experimenten mit Variation der Photofrin-Konzentration (siehe Abbildung 4.30) lediglich die Abklingzeit des Singulett-Sauerstoffs in Phosphatidylcholin bestimmt werden. Diese ist unabhängig von der Natriumazid-Konzentration und ergibt sich zu $10 \pm 2 \mu\text{s}$, identisch mit der Abklingzeit in Suspensionen von Phosphatidylcholin in H_2O , die durch Variation der Photofrin-Konzentration bestimmt wurde. Ein Grund, weshalb hier überhaupt keine Veränderung der Abklingzeit bei verschiedenen Natriumazid-Konzentrationen festzustellen ist, kann nicht angegeben werden. Möglicherweise dringt in H_2O das Natriumazid nicht in ausreichendem Maße in die Lipidtröpfchen ein.

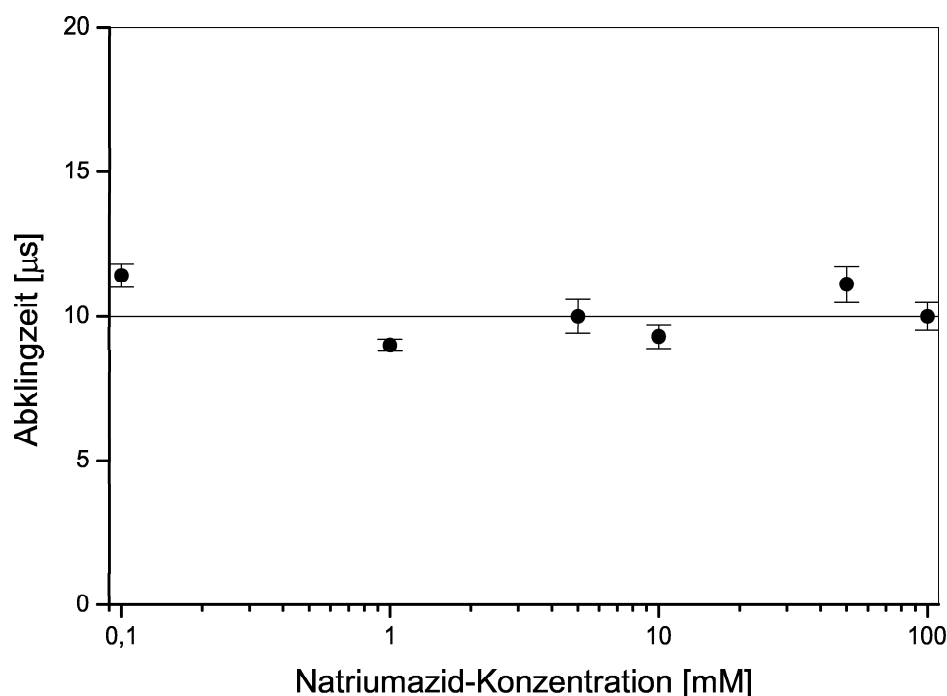


Abbildung 4.32: Abklingzeiten der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz bei Variation der Natriumazid-Konzentration in Suspensionen von Phosphatidylcholin in H_2O mit $50 \frac{\mu g}{ml}$ Photofrin

4.2.2.2 Variation der Zeit zwischen der Zugabe von Natriumazid und der Lumineszenzmessung

Wie in Kapitel 4.2.2.1 gezeigt wurde, konnte durch Zugabe von Natriumazid zu den Lipidsuspensionen in D_2O lediglich die Abklingzeit des Singulett-Sauerstoffs in D_2O verkürzt werden, die Abklingzeit des Singulett-Sauerstoffs in Phosphatidylcholin wurde weder in D_2O noch in H_2O beeinflusst. Dies mag daran liegen, daß es sich bei Natriumazid um ein hydrophiles Molekül handelt [PV79], so daß es innerhalb der Wartezeit von einer Minute zwischen Quencherzugabe und Lumineszenzmessung nicht in die Phosphatidylcholintröpfchen einzudringen vermag. Als weiteres Vorgehen bietet sich deshalb eine Verlängerung der Wartezeit zwischen der Zugabe von Natriumazid zu den Lipidsuspensionen (s. u.) oder aber die Verwendung einer anderen Quencher-substanz an (Kapitel 4.2.2.3/4).

Abbildung 4.33 auf Seite 118 zeigt die gemessenen Abklingzeiten der Lumineszenz von Singulett-Sauerstoff in Lipidsuspensionen mit $50 \frac{\mu g}{ml}$ Photofrin in D_2O bei Zugabe von 1 mM Natriumazid in Abhängigkeit der Wartezeit zwischen der Natriumazidzugabe und der Lumineszenzmessung.

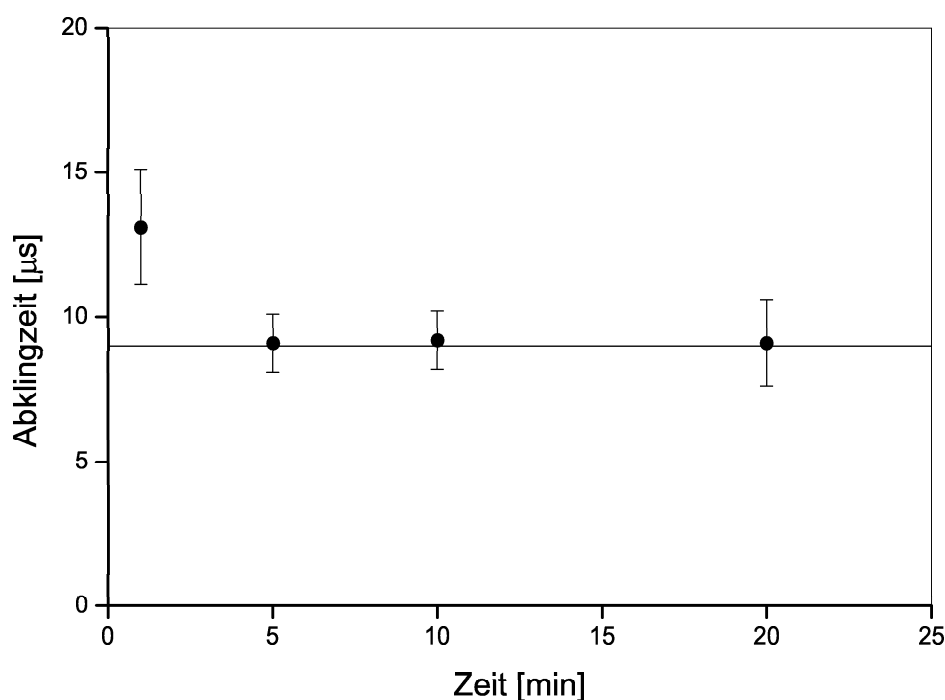


Abbildung 4.33: Abklingzeiten der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz bei Variation der Wartezeit zwischen der Zugabe von 1 mM Natriumazid zu Suspensionen von Phosphatidylcholin in D_2O mit $50 \frac{\mu g}{ml}$ Photofrin und der Lumineszenzmessung

Wie man erkennt, läßt sich die Abklingzeit der Lumineszenz von Singulett-Sauerstoff in Phosphatidylcholin durch Erhöhung der Wartezeit zwischen der Quencherzugabe von einer Minute (Standard) von $13 \pm 2 \mu s$ auf $9 \pm 2 \mu s$ reduzieren, wobei dieser Wert dann unabhängig ist von der Wartezeit im Intervall von fünf bis 20 Minuten. Dies spricht ebenfalls für die These einer sehr niedrigen Löslichkeitsgrenze von Natriumazid in Phosphatidylcholin, welche zwischen einer und fünf Minuten nach Zugabe von 1 mM Natriumazid zur Suspension erreicht wird. Bei einem Vergleich mit Abbildung 4.31 stellt man fest, daß hier bei einer Wartezeit von einer Minute die Abklingzeit mit $13 \pm 2 \mu s$ länger ist als die entsprechende (Natriumazid-Konzentration 1 mM, Wartezeit eine Minute) in Abbildung 4.31 mit $7 \pm 2 \mu s$. Dies läßt eine Abschätzung des für Lipidsuspensionen geltenden systematischen Fehlers zu, welcher demnach mindestens um zwei Mikrosekunden größer sein müßte als der bisher verwendete. Letzterer wurde als gleichgroß mit demjenigen bei homogenen Lösungen (3 % des Meßwertes, siehe auch Seite 66) angenommen.

Abbildung 4.34 auf Seite 119 zeigt nun die gemessenen Abklingzeiten der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz in Lipidsuspensionen mit $50 \frac{\mu g}{ml}$ Photofrin in H_2O bei Zugabe von 1 mM Natriumazid in Abhängigkeit der Wartezeit zwischen der Natriumazidzugabe und der Lumineszenzmessung.

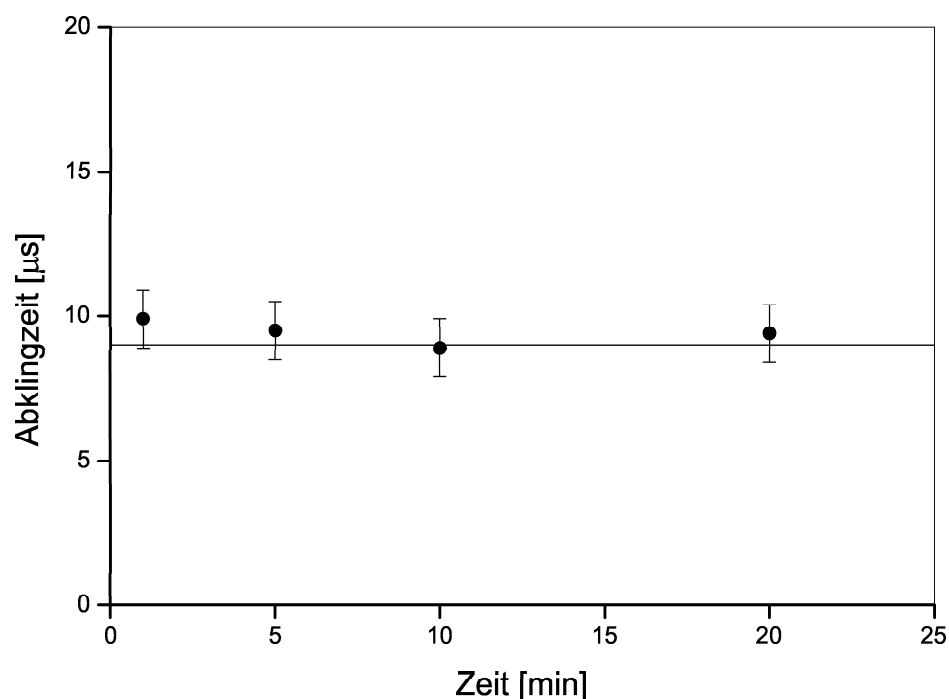


Abbildung 4.34: Abklingzeiten der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz bei Variation der Wartezeit zwischen der Zugabe von 1 mM Natriumazid zu Suspensionen von Phosphatidylcholin in H_2O mit $50 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Photofrin und der Lumineszenzmessung

Wie zu erkennen ist, bleibt hier die Abklingzeit des Singulett-Sauerstoffs in Phosphatidylcholin in H_2O mit $9 \pm 1 \mu\text{s}$ konstant und ist somit unabhängig von der Wartezeit zwischen der Zugabe von Natriumazid und der Lumineszenzmessung. In H_2O dringt also Natriumazid nicht in die Phosphatidylcholintröpfchen ein.

Zusammenfassend läßt sich also sagen, daß in Suspensionen von Phosphatidylcholin in D_2O der in Phosphatidylcholin lokalisierte Singulett-Sauerstoff sich durch Natriumazid lediglich in sehr geringem Maße quenchen läßt, wohingegen in H_2O das Natriumazid offensichtlich nicht in Phosphatidylcholin einzudringen vermag. Aus diesem Grunde wird im folgenden der Quencher Histidin verwendet.

4.2.2.3 Variation der Histidin-Konzentration

Abbildung 4.35 zeigt nun die gemessenen Abklingzeiten der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz bei Zugabe von Histidin in verschiedenen Konzentrationen zu den Lipidsuspensionen in D_2O .

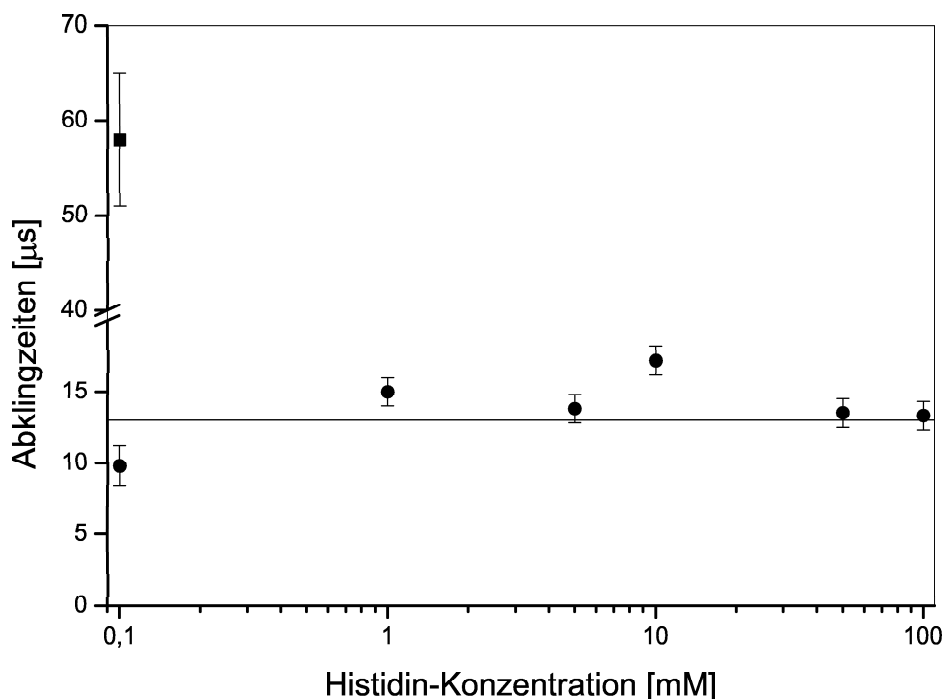


Abbildung 4.35: Abklingzeiten der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz bei Variation der Histidin-Konzentration in Suspensionen von Phosphatidylcholin in D_2O mit $50 \frac{\mu g}{ml}$ Photofrin

Wie zu erkennen ist, konnte analog zu Natriumazid nur bei der niedrigsten Histidin-Konzentration von 0,1 mM ein bi-exponentieller Fit verwendet werden. Die Abklingzeit des Singulett-Sauerstoffs in D_2O wurde dadurch zu $58 \pm 7 \mu s$ bestimmt (berechneter Wert in einer Lösung von 0,1 mM Histidin in D_2O : $52 \mu s$). In einer Lösung von 1 mM Histidin in reinem D_2O läge die Abklingzeit des Singulett-Sauerstoffs bei etwa $16 \mu s$. Bei dieser Histidin-Konzentration in Suspension ist somit ein bi-exponentielles Abklingen der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz aufgrund des experimentellen Rauschens nicht beobachtbar. Bei noch größeren Histidin-Konzentrationen ist der Beitrag des Singulett-Sauerstoffs in D_2O zur gesamten Lumineszenz zu klein, um innerhalb der Meßgenauigkeit ein bi-exponentielles Abklingen zu erhalten. Die Abklingzeit des Singulett-Sauerstoffs in Phosphatidylcholin ist mit $13 \pm 4 \mu s$ für alle Histidin-Konzentrationen konstant und darüberhinaus identisch mit der Abklingzeit von Singulett-Sauerstoff in Phosphatidylcholin in D_2O -Suspensionen ohne Zugabe von Histidin. Offensichtlich

dringt hier das Histidin nicht in ausreichendem Maße in die Lipidtröpfchen ein, um eine meßbare Verkürzung der Abklingzeit des Singulett-Sauerstoffs darin zu bewirken.

Abbildung 4.36 zeigt nun die gemessenen Abklingzeiten der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz bei Zugabe von Histidin in verschiedenen Konzentrationen zu den Lipidsuspensionen in H_2O .

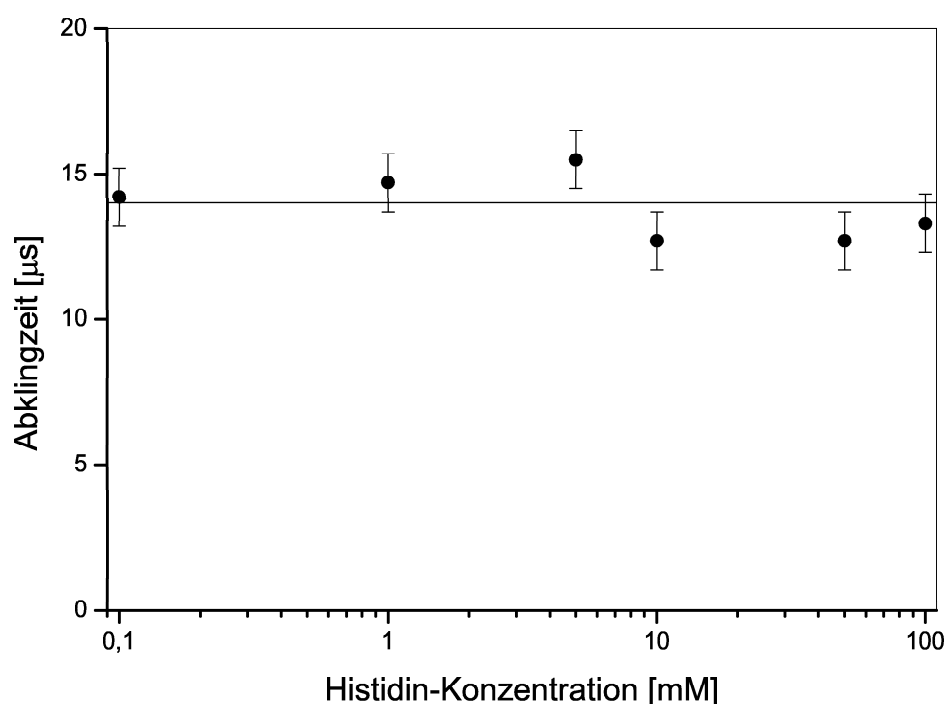


Abbildung 4.36: Abklingzeiten der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz bei Variation der Histidin-Konzentration in Suspensionen von Phosphatidylcholin in H_2O mit $50 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Photofrin

Wie zu erkennen ist, bleibt hier die Abklingzeit des Singulett-Sauerstoffs in Phosphatidylcholin in H_2O mit $14 \pm 2 \mu\text{s}$ konstant und ist somit unabhängig von der Histidin-Konzentration. Auch in H_2O -Suspensionen dringt das Histidin also offensichtlich nicht in die Lipidtröpfchen ein. Es ist jedoch noch zu bemerken, daß die Abklingzeit des Singulett-Sauerstoffs in Phosphatidylcholin in H_2O -Suspensionen bei Zugabe von Histidin etwa so lang ist wie die bei hohen Photofrin-Konzentrationen gemessene (siehe Abbildung 4.30 auf Seite 114). Ein Erklärungsansatz hierzu kann nicht gegeben werden.

4.2.2.4 Variation der Zeit zwischen der Zugabe von Histidin und der Lumineszenzmessung

Mit Histidin wurde analog zu Natriumazid eine Meßreihe durchgeführt, bei der die Wartezeit zwischen der Zugabe des Quenchers und der Lumineszenzmessung schrittweise erhöht wurde. Abbildung 4.37 zeigt die gemessenen Abklingzeiten der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz in Lipidsuspensionen mit $50 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Photofrin in D_2O bei Zugabe von 1 mM Histidin in Abhängigkeit der Wartezeit zwischen der Histidinzugabe und der Lumineszenzmessung.

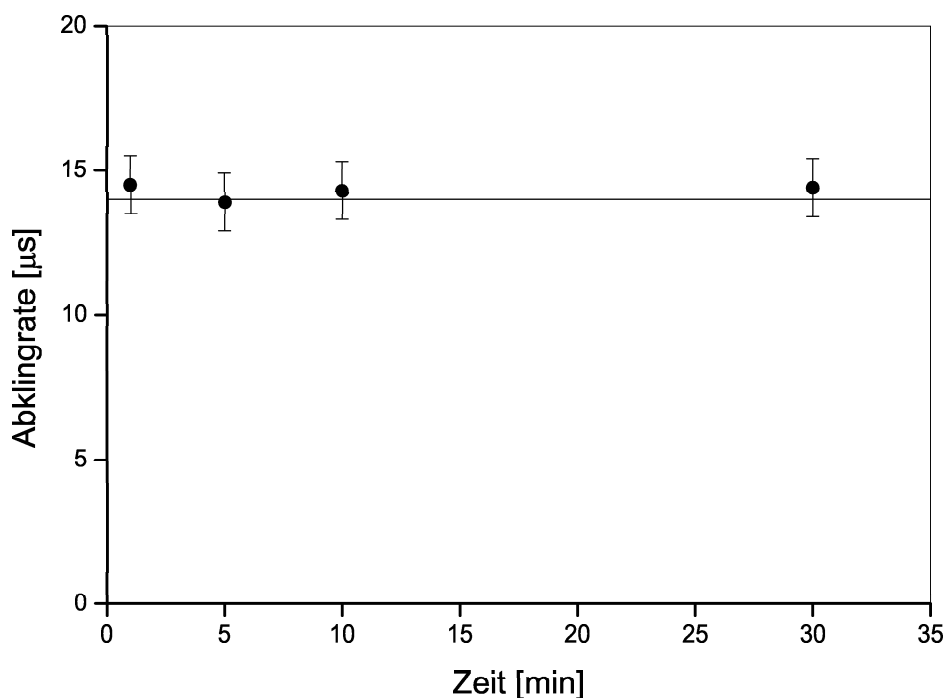


Abbildung 4.37: Abklingzeiten der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz bei Variation der Wartezeit zwischen der Zugabe von 1 mM Histidin zu Suspensionen von Phosphatidylcholin in D_2O mit $50 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Photofrin und der Lumineszenzmessung

Wie man erkennt, läßt sich die Abklingzeit der Lumineszenz von Singulett-Sauerstoff in Phosphatidylcholin in D_2O durch Erhöhung der Wartezeit zwischen der Quencherzugabe von einer Minute (Standard) auf 30 Minuten auch nicht reduzieren, die Abklingzeit beträgt $14 \pm 1 \mu\text{s}$.

Abbildung 4.38 auf Seite 123 zeigt nun die gemessenen Abklingzeiten der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz in Lipidsuspensionen mit $50 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Photofrin in H_2O bei Zugabe

von 1 mM Histidin in Abhängigkeit der Wartezeit zwischen der Histidinzugabe und der Lumineszenzmessung. Auch in Suspensionen von Phosphatidylcholin in H_2O lässt sich also die Abklingzeit der Lumineszenz von Singulett-Sauerstoff in Phosphatidylcholin durch Erhöhung der Wartezeit zwischen der Quencherzugabe von einer Minute (Standard) auf 30 Minuten nicht reduzieren, die Abklingzeit beträgt $11 \pm 1 \mu\text{s}$ und ist somit identisch zu derjenigen in Suspensionen von Phosphatidylcholin in H_2O bei Variation der Zeit zwischen Histidinzugabe und Lumineszenzmessung.

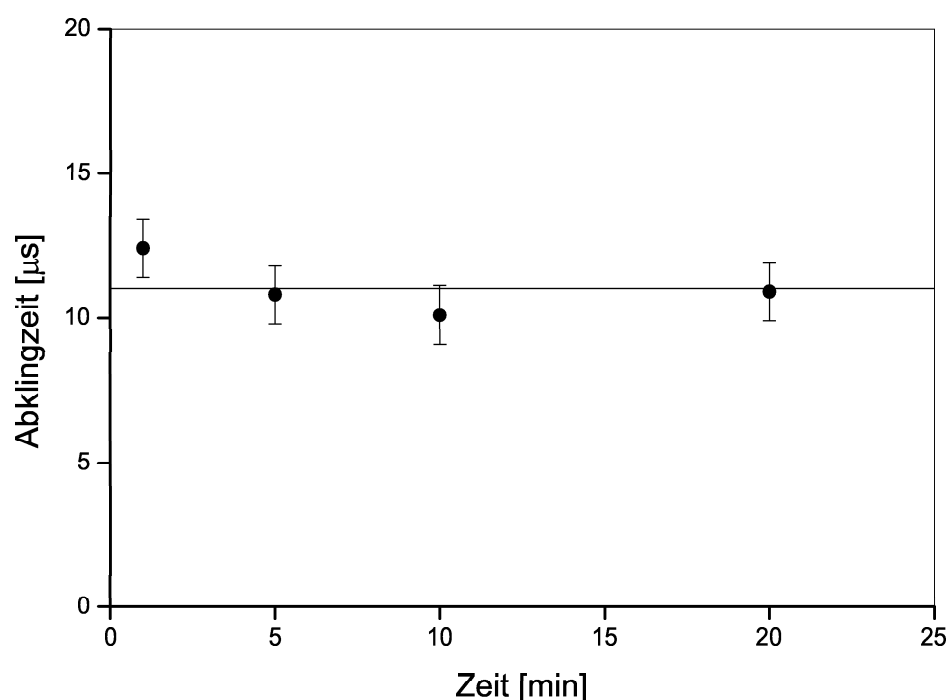


Abbildung 4.38: Abklingzeiten der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz bei Variation der Wartezeit zwischen der Zugabe von 1 mM Histidin zu Suspensionen von Phosphatidylcholin in H_2O mit $50 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Photofrin und der Lumineszenzmessung

4.2.2.5 Wärmebadbehandlung

Da die bisherigen Versuche, mit den zur Verfügung stehenden Quenchersubstanzen Natriumazid und Histidin die Singulett-Sauerstoff-Lebensdauer in Phosphatidylcholin durch Erhöhung der Quencher-Konzentration bzw. durch längere Wartezeiten zwischen Zugabe des Quenchers und der Messung der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz immer weiter zu verkürzen, offensichtlich nicht zum Erfolg führen, werden nun die zu bestrahlenden Lipidsuspensionen für eine Zeitdauer von einer Stunde in ein Wärmebad bei

36 °C gestellt. Somit wird zum einen nochmals die Zeitdauer zwischen Quencherzugabe und Lumineszenzmessung verlängert, zum anderen findet etwa bei der Wärmebadtemperatur bei Phosphatidylcholinen ein Phasenübergang statt, der einen Wechsel in der Oberflächenstruktur der Lipidpartikel induziert [HLM82].

Die Abbildungen 4.39 und 4.40 auf Seite 125 zeigen nun die gemessenen Abklingzeiten der Lumineszenz des Singulett-Sauerstoffs in Phosphatidylcholin in D₂O (4.39) bzw. in H₂O (4.40) bei Zugabe von Natriumazid oder Histidin in verschiedenen Konzentrationen mit anschließender Wärmebadbehandlung für eine Stunde. Wie zu erkennen ist, läßt sich sowohl bei Verwendung von D₂O wie auch von H₂O durch die Wärmebadbehandlung nach der Quencherzugabe zumindest im Falle des Natriumazids die Abklingzeit des Singulett-Sauerstoffs in Phosphatidylcholin reduzieren, und zwar mit $6 \pm 1 \mu\text{s}$ bei $[\text{NaN}_3] = 5 \text{ mM}$ auf knapp die Hälfte des Wertes von $11 \pm 1 \mu\text{s}$ bei $[\text{NaN}_3] = 0,01 \text{ mM}$. Möglicherweise ist es nun dem – verglichen mit Histidin – relativ kleinen Azidanion durch die Veränderung der Oberflächenstruktur der Lipidtröpfchen möglich, in diese einzudringen, und zwar so, daß die Azidanion-Konzentration im Lipidtröpfchen, wie erwartet, bei steigender Natriumazid-Konzentration in Suspension zunimmt.

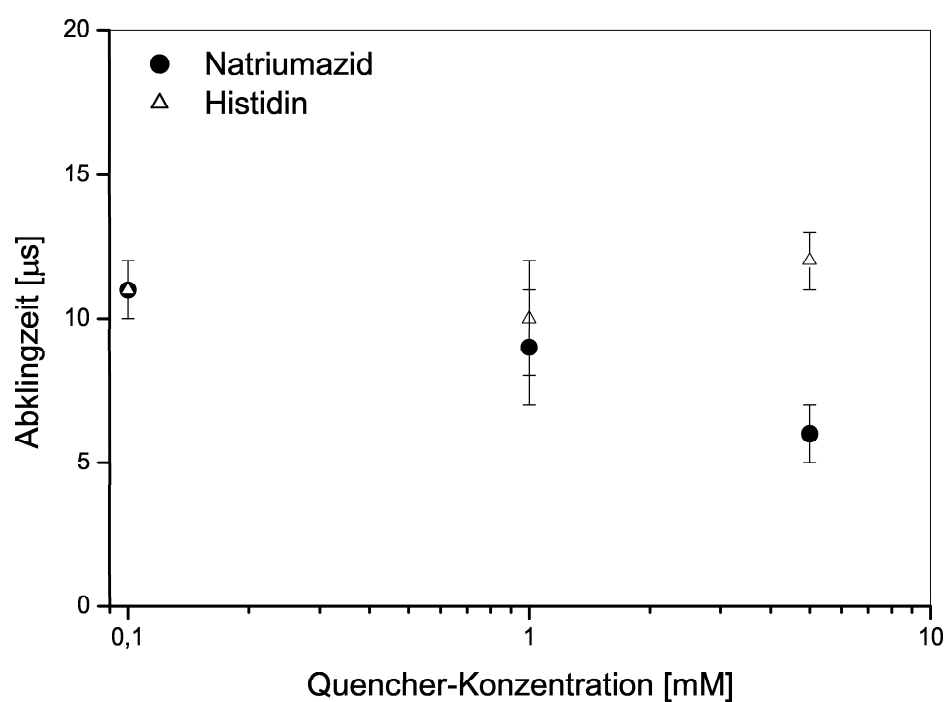


Abbildung 4.39: Abklingzeiten der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz bei Zugabe von Natriumazid oder Histidin in verschiedenen Konzentrationen zu Suspensionen von Phosphatidylcholin in D₂O mit 50 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Photofrin mit anschließender Wärmebadbehandlung

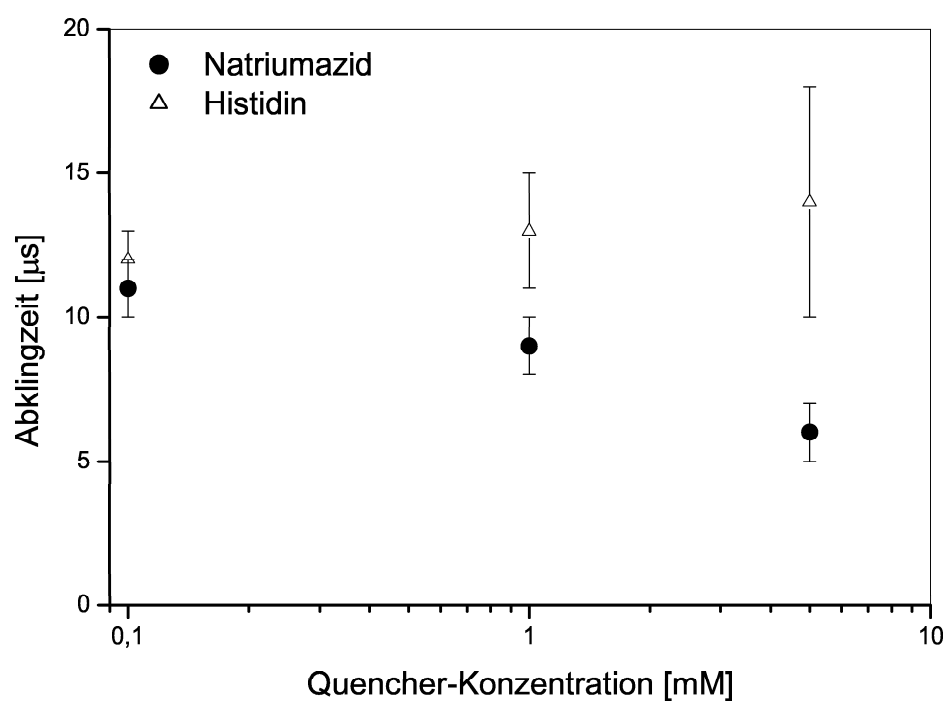


Abbildung 4.40: Abklingzeiten der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz bei Zugabe von Natriumazid oder Histidin in verschiedenen Konzentrationen zu Suspensionen von Phosphatidylcholin in H₂O mit 50 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Photofrin mit anschließender Wärmebadbehandlung

4.3 *In vitro* Experimente

Im folgenden werden die Ergebnisse der Experimente *in vitro* vorgestellt und diskutiert. Um eine genauere Interpretation der Ergebnisse der Singulett-Sauerstoff-Abklingzeiten zu ermöglichen, muß zunächst die subzelluläre Lokalisation von Photofrin bei den verwendeten Inkubationszeiten und -konzentrationen bestimmt werden.

4.3.1 Subzelluläre Lokalisation von Photofrin

In diesem Kapitel werden nun Falschfarbendarstellungen der Koloalisationsaufnahmen gezeigt. Dabei ist die Farbe Blau gleichzusetzen mit der Fluoreszenz des Farbstoffes Hoechst 33342, welcher im Zellkern lokalisiert ist, die Farbe Grün bezeichnet die Fluoreszenz von Rhodamin 6G, das zum Einfärben der Mitochondrien verwendet wurde, und die Farbe Rot deutet die Fluoreszenz von Photofrin und damit dessen subzelluläre Lokalisation an (vgl. Abbildung 3.18 auf Seite 59). Im Falle einer Photofrin-Inkubationszeit von 90 Minuten wurden zusätzlich Intensitätsprofile der Photofrinfluoreszenz angefertigt entlang derjenigen Achsen, welche durch schwarze Linien angedeutet sind. Die schwarz-weiß-Bilder zeigen die jeweils zugehörigen Durchlichtbilder.

4.3.1.1 90 Minuten Inkubationszeit

Die Abbildungen 4.41, 4.42 auf Seite 127 sowie Abbildung 4.43 auf Seite 128 zeigen nun die subzelluläre Lokalisation von Photofrin (rot) in HT29-Zellen bei einer Inkubationszeit von 90 Minuten und einer Inkubationskonzentration von $5 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ (Abbildung 4.41), $20 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ (Abbildung 4.42) und $50 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ (Abbildung 4.43). Der weiße Balken innerhalb der Bilder repräsentiert einen Maßstab von $10 \mu\text{m}$ Länge. Wie dieser Darstellung zu entnehmen ist, lokalisiert Photofrin bei dieser Inkubationszeit nahezu ausschließlich in der Plasmamembran, unabhängig von der Inkubationskonzentration.

Zur genaueren Überprüfung der subzellulären Lokalisation von Photofrin bei 90 Minuten Inkubationszeit müssen die Intensitätsprofile der Photofrinfluoreszenz betrachtet werden. Abbildung 4.44 auf Seite 128 zeigt die über verschiedene Zellen gemittelten Intensitätsprofile der Photofrinfluoreszenz für die verschiedenen Inkubationskonzentrationen entlang der in Abbildungen 4.41 bis 4.43 gezeigten Schnittachsen. Im Falle einer Inkubationskonzentration von $5 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ (rote Kurve) wurde über zehn Intensitätsprofile bei fünf HT29-Zellen gemittelt, bei $20 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ (blaue Kurve) über 18 Profile bei neun Zellen und bei $50 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Inkubationskonzentration (schwarze Kurve) über 20 Profile bei zehn Zellen. Wie man erkennt, ist bei jeder der drei Inkubationskonzentrationen im Zellinneren noch Photofrinfluoreszenzintensität vorhanden. Um zu klären, ob nun Photofrin in der Tat nicht nur in der Plasmamembran sondern auch im Zellinneren lokalisiert ist, oder aber die im Zellinneren nicht-verschwindende Fluoreszenzintensität darauf zurückzuführen

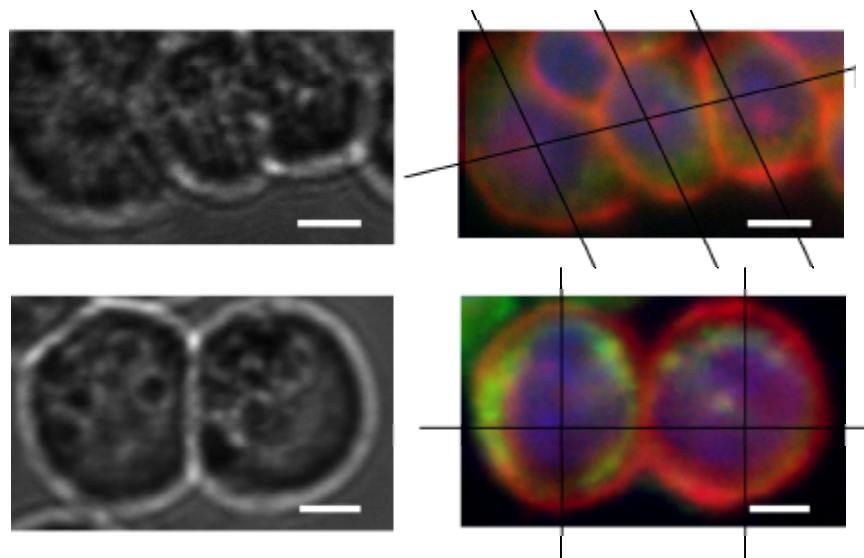


Abbildung 4.41: Subzelluläre Lokalisation von Photofrin (rot) in HT29-Zellen bei einer Inkubation von $5 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ für 90 Minuten; links: Durchlichtaufnahme, rechts: Falschfarbendarstellung (blau: Zellkern, grün: Mitochondrien); weißer Balken: $10 \mu\text{m}$

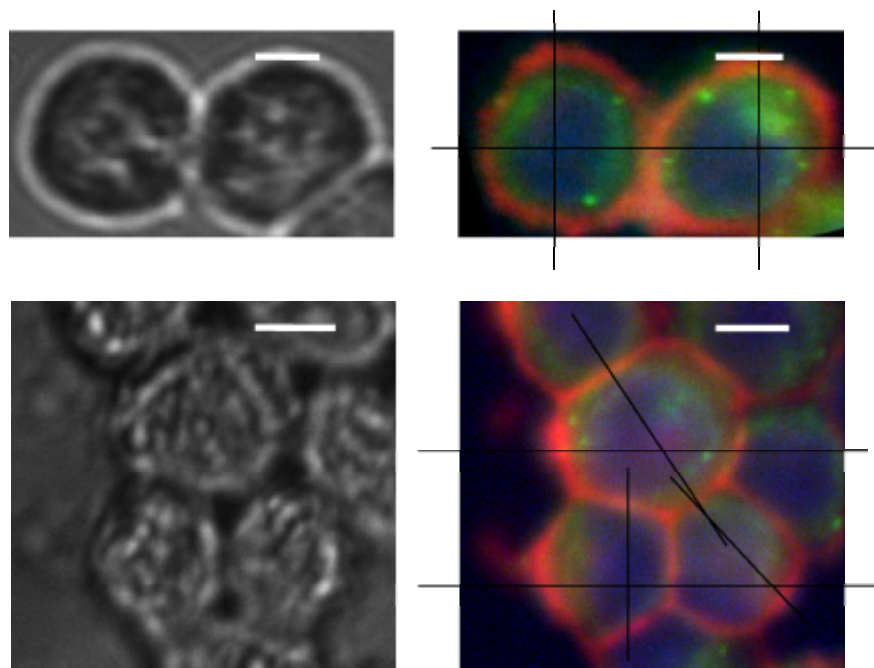


Abbildung 4.42: Subzelluläre Lokalisation von Photofrin (rot) in HT29-Zellen bei einer Inkubation von $20 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ für 90 Minuten; links: Durchlichtaufnahme, rechts: Falschfarbendarstellung (blau: Zellkern, grün: Mitochondrien); weißer Balken: $10 \mu\text{m}$

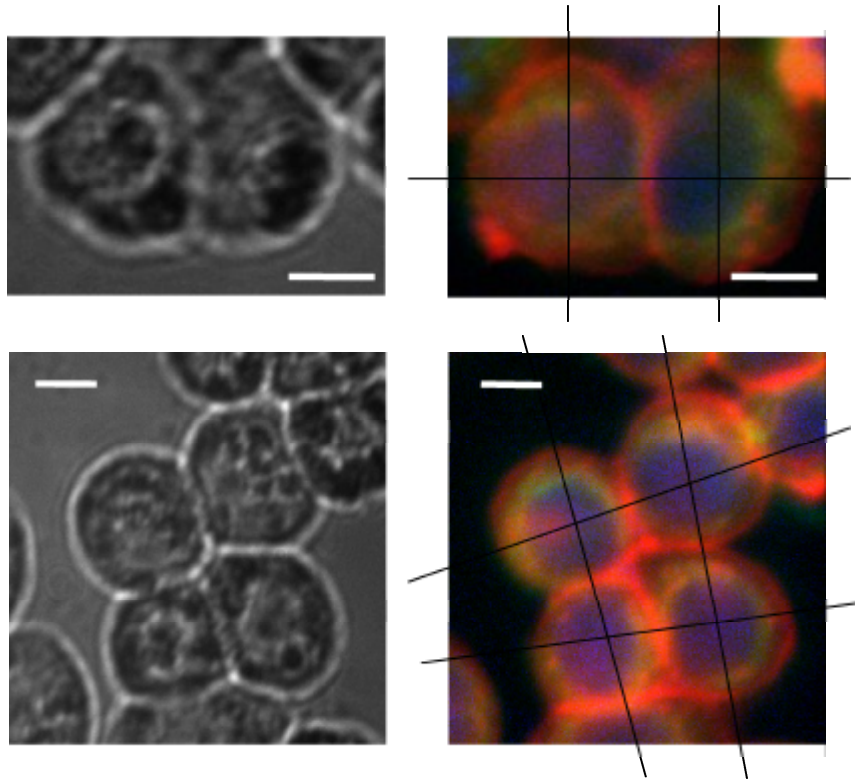


Abbildung 4.43: Subzelluläre Lokalisation von Photofrin (rot) in HT29-Zellen bei einer Inkubation von $50 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ für 90 Minuten; links: Durchlichtaufnahme, rechts: Falschfarbendarstellung (blau: Zellkern, grün: Mitochondrien); weißer Balken: $10 \mu\text{m}$

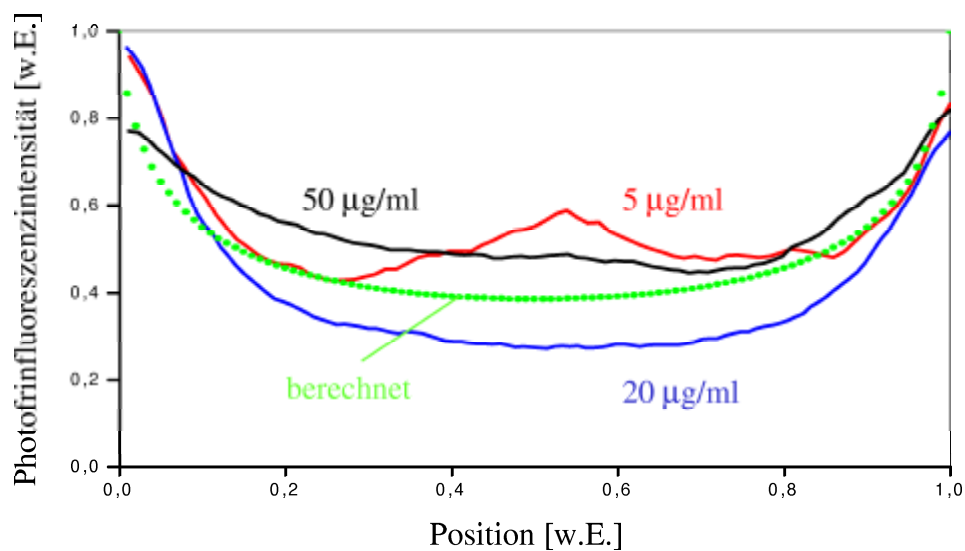


Abbildung 4.44: Photofrinfluoreszenzintensität in HT29-Zellen bei einer Inkubationszeit von 90 Minuten entlang der Schnittachsen mit berechneter Kurve

ist, daß Fluoreszenzlicht von außerhalb der Fokusebene auf den CCD-Chip trifft, wurde die zu erwartende Fluoreszenzintensität abgeschätzt unter der Näherung, daß die detektierte Intensität proportional ist zum Schnittvolumen der ca. 9 nm dicken Plasmamembran und einem Kanal, dessen laterales Ausmaß dem Auflösungsvermögen des Mikroskops ($1,5 \mu\text{m}$) entspricht. Dieses Schnittvolumen ist in Abbildung 4.45 rot dargestellt. Die zugehörige Kurve ist in Abbildung 4.44 grün gepunktet eingezeichnet.

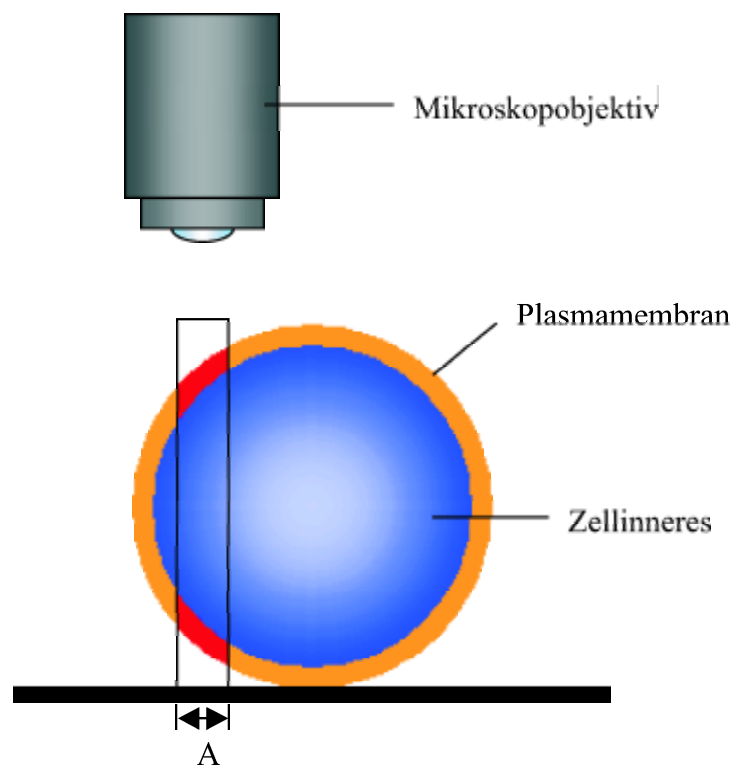


Abbildung 4.45: Modellgeometrie zur näherungsweisen Berechnung der zu erwartenden Photofluoreszenzintensität bei 90 Minuten Inkubationszeit; A: Auflösungsvermögen des Mikroskops ($1,5 \mu\text{m}$)

Wie in Abbildung 4.44 zu erkennen ist, stellt die mit der in Abbildung 4.45 dargestellten Modellgeometrie berechnete Fluoreszenzintensitätskurve etwa den Mittelwert der gemessenen Intensitätsprofile dar. Die Abweichungen dürften zum einen mit der Tatsache, daß nur jeweils über relativ wenige Profile gemittelt wurde, zum anderen durch die näherungsweise Berechnung, bei der die Tiefenschärfe des Mikroskops nicht in Betracht gezogen wurde, zu begründen sein. Somit ist also anzunehmen, daß bei einer Inkubationszeit von 90 Minuten das Photofrin ausschließlich in der Plasmamembran der HT29-Zellen lokalisiert ist.

4.3.1.2 24 Stunden Inkubationszeit

Die Abbildungen 4.46, 4.47 auf Seite 131 sowie Abbildung 4.48 auf Seite 131 zeigen nun die subzelluläre Lokalisation von Photofrin (rot) in HT29-Zellen bei einer Inkubationszeit von 24 Stunden und einer Inkubationskonzentration von $5 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ (Abbildung 4.46), $20 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ (Abbildung 4.47) und $50 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ (Abbildung 4.48). Der weiße Balken innerhalb der Bilder repräsentiert einen Maßstab von $10 \mu\text{m}$ Länge.

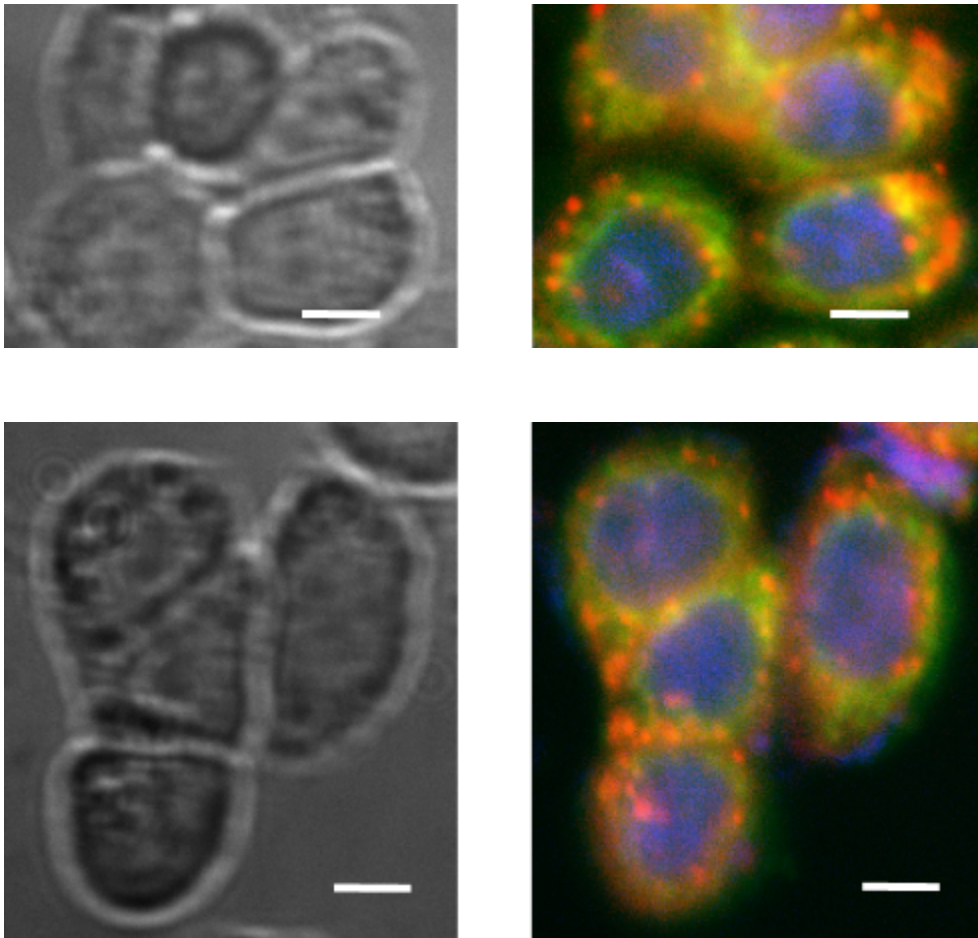


Abbildung 4.46: Subzelluläre Lokalisation von Photofrin (rot) in HT29-Zellen bei einer Inkubation von $5 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ für 24 Stunden; links: Durchlichtaufnahme, rechts: Falschfarbendarstellung (blau: Zellkern, grün: Mitochondrien); weißer Balken: $10 \mu\text{m}$

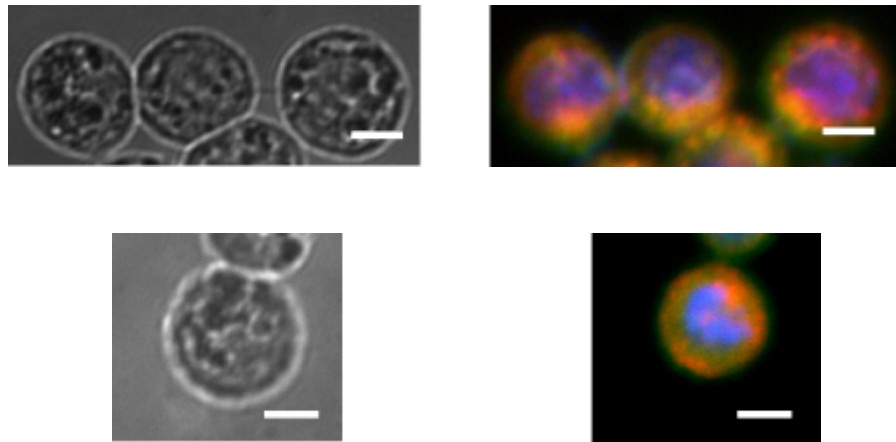


Abbildung 4.47: Subzelluläre Lokalisation von Photofrin (rot) in HT29-Zellen bei einer Inkubation von $20 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ für 24 Stunden; links: Durchlichtaufnahme, rechts: Falschfarbendarstellung (blau: Zellkern, grün: Mitochondrien); weißer Balken: $10 \mu\text{m}$

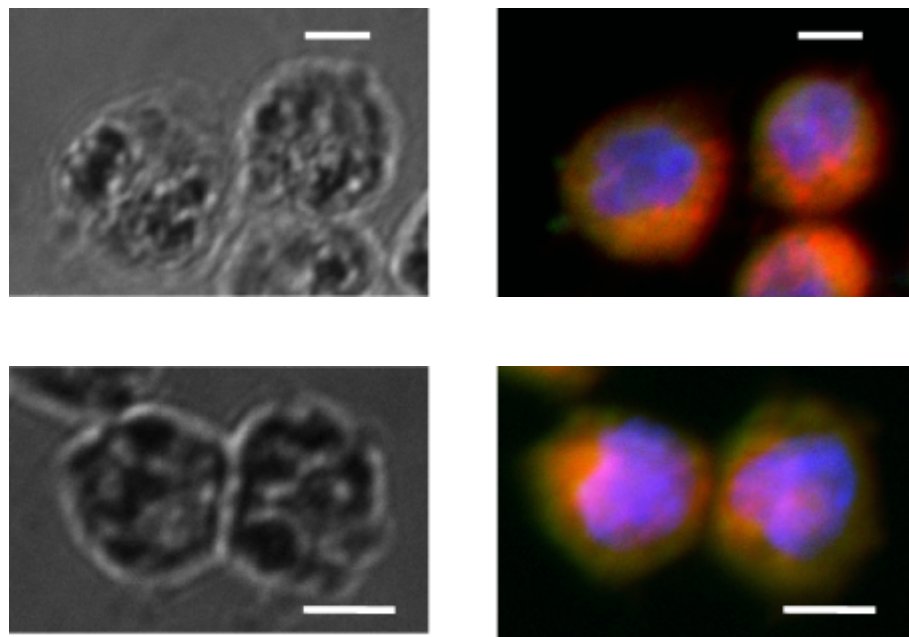


Abbildung 4.48: Subzelluläre Lokalisation von Photofrin (rot) in HT29-Zellen bei einer Inkubation von $50 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ für 24 Stunden; links: Durchlichtaufnahme, rechts: Falschfarbendarstellung (blau: Zellkern, grün: Mitochondrien); weißer Balken: $10 \mu\text{m}$

Wie in Abbildungen 4.46 bis 4.48 zu erkennen ist, ist Photofrin bei einer Inkubationszeit von 24 Stunden kolokalisiert mit Rhodamin 6G. Dies bedeutet, daß nun Photofrin nicht mehr in der Plasmamembran, sondern in den Mitochondrien lokalisiert ist. Dies hat zur Konsequenz, daß nicht über verschiedene Intensitätsprofile gemittelt werden kann, da zum einen mit den verwendeten Fluoreszenzfarbstoffen verschiedene Zellen nicht voneinander abgegrenzt werden können, und zum anderen Zellen nicht völlig rund sind, so daß der Abstand zwischen den entgegengesetzt liegenden Schnittpunkten von Plasmamembran und Schnittachsen nicht normiert werden kann. Es sei hier noch angemerkt, daß Photofrin generell eine Affinität gegenüber zellulären Membranen besitzt [MRM88, WO97], so daß Photofrin bei einer Inkubationszeit von 24 Stunden in den Membranen der Mitochondrien lokalisiert sein dürfte.

Zusammenfassend läßt sich also sagen, daß bei einer Inkubationszeit von 90 Minuten Photofrin in der Plasmamembran lokalisiert ist, unabhängig von der Inkubationskonzentration. Bei einer Inkubationszeit von 24 Stunden befindet sich das Photofrin in den Membranen der Mitochondrien.

4.3.2 Lumineszenz von Singulett-Sauerstoff in Zellsuspensionen

Im folgenden werden nun die Meßergebnisse der Lumineszenz von Singulett-Sauerstoff, generiert durch Photofrin innerhalb von HT29-Zellen, welche in H₂O-PBS bzw. D₂O-PBS suspendiert sind, vorgestellt und diskutiert. Aufgrund der verschiedenen Komponenten aus denen Membranen aufgebaut sind und damit der Vielzahl an mikroskopischen Umgebungen innerhalb der Zellen ist ein multi-exponentielles Abklingen der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz zu erwarten. Um bei den HT29-Suspensionen die Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz von dem auftretenden großen Streusignal bei der Wellenlänge von 1270 nm zu separieren, wurden zunächst mit beiden Lösungsmitteln Lumineszenzmessungen mit nicht inkubierten Zellen bei gleicher Zellkonzentration durchgeführt und anschließend von den Messungen der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz mit inkubierten Zellen abgezogen. Die so gewonnenen Lumineszenzkurven werden im folgenden als korrigierte Lumineszenz bezeichnet.

4.3.2.1 HT29 in H₂O-PBS

Abbildung 4.49 auf Seite 134 zeigt nun exemplarisch eine Messung der korrigierten Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz, generiert durch Laserbestrahlung von Photofrin-inkubierten HT29 in H₂O-PBS. Die Inkubationskonzentration beträgt hier 50 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ und die Inkubationszeit 90 Minuten. Wie zu erkennen ist, klingt, analog zu den Lipidsuspensionen (Abbildung 4.28 b) auf Seite 111), die Lumineszenz des Singulett-Sauerstoffs innerhalb des experimentellen Rauschens mono-exponentiell ab. Die Abklingzeit beträgt $16 \pm 4 \mu\text{s}$.

Tabelle 4.7 auf Seite 134 zeigt sämtliche Werte der korrigierten Lumineszenzabklingzeit des Singulett-Sauerstoffs bei Photofrin-inkubierten HT29 suspendiert in H₂O-PBS für die verschiedenen Inkubationen ohne sowie mit Zugabe der Quencher Natriumazid (NaN₃) und Histidin. Wie Tabelle 4.7 zeigt, variieren die Abklingzeiten der korrigierten Lumineszenz ohne Zusatz von Quenchern von 12 bis 21 μs mit einem Mittelwert von $16 \pm 4 \mu\text{s}$. Dieser Mittelwert ist innerhalb des experimentellen Fehlers identisch mit der Abklingzeit des Singulett-Sauerstoffs in Phosphatidylcholin von $12 \pm 2 \mu\text{s}$ (siehe Kapitel 4.2.1), so daß davon ausgegangen werden kann, daß die gemessene Lumineszenz auf Singulett-Sauerstoff zurückzuführen ist, der in den Lipidbereichen innerhalb der Plasmamembran bei 90 Minuten Inkubationszeit bzw. in den Lipidbereichen der Membranen der Mitochondrien bei 24 Stunden Inkubationszeit erzeugt wird.

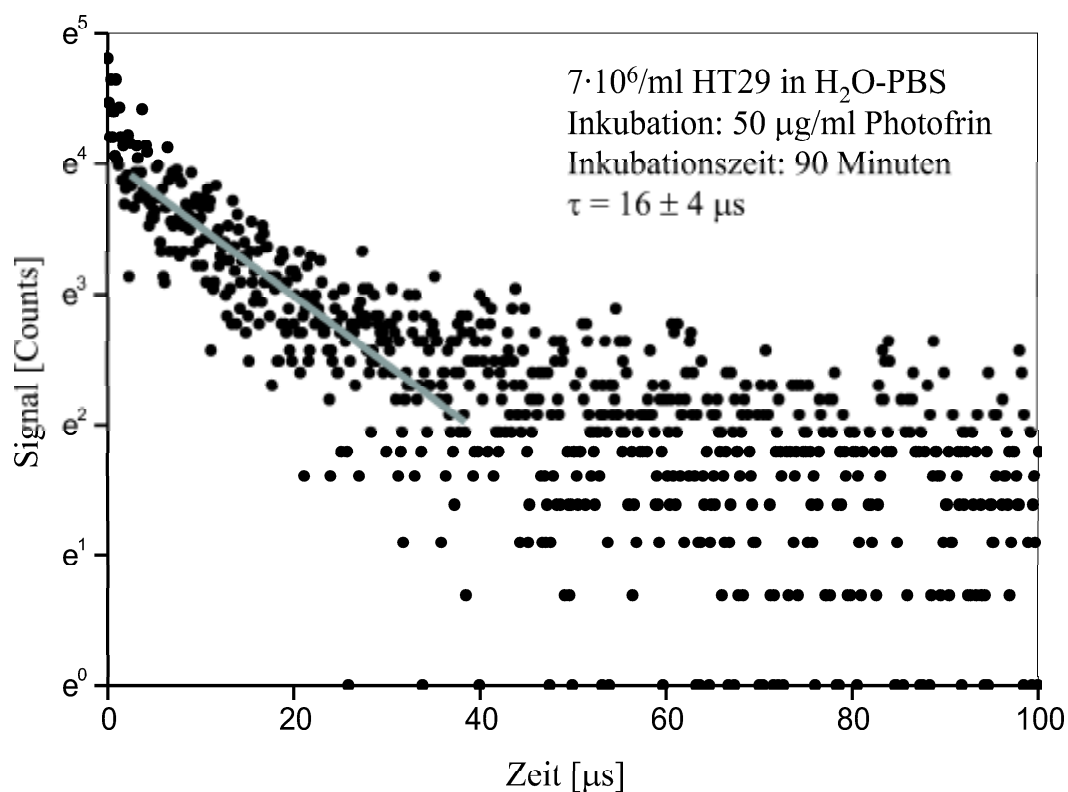


Abbildung 4.49: Exemplarische Einzelmessung der korrigierten Lumineszenz von Singulett-Sauerstoff generiert durch HT29-Zellen in H₂O-PBS bei einer Inkubation mit 50 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Photofrin für 90 Minuten

Inkubationszeit [Stunden]	Inkubationskonzentration [$\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$]	Abklingzeit ohne Quencher [μs]	Abklingzeit + 50 mM NaN ₃ [μs]	Abklingzeit + 50 mM Histidin [μs]
1,5	5	12 ± 4	–	–
1,5	20	19 ± 4	9 ± 4	11 ± 4
1,5	50	16 ± 4	6 ± 3	–
24	5	15 ± 4	7 ± 4	–
24	20	21 ± 4	16 ± 3	–
24	50	16 ± 3	8 ± 3	8 ± 4

Tabelle 4.7: Abklingzeiten der korrigierten Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz in HT29-Zellen suspendiert in H₂O-PBS;
–: Signal/Rausch-Verhältnis zu gering zur Bestimmung einer Abklingzeit

Bisher sind in der Literatur keine Berichte über die Messung der Lumineszenz von Singulett-Sauerstoff in Zellsuspensionen in H_2O -PBS bekannt. Die Tatsache, daß im Rahmen der vorliegenden Arbeit überhaupt der Nachweis der Lumineszenz von intrazellulärem Singulett-Sauerstoff gelang, dürfte zum einen eine Folge der Verwendung von HT29-Zellen sein. Diese besitzen zumindest in der Plasmamembran mit $75 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ [ALF85] eine wesentlich geringere Protein-Konzentration wie die Membranhüllen von Erythrozyten mit $580 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ [P78], welche suspendiert in D_2O bereits häufig für ähnliche Experimente verwendet wurden [K91, OSH97, OZM99, PMW90] (siehe auch Kapitel 3.2.3). Zum anderen ist wohl die im Kontext der Messung der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz bis auf eine einzige Ausnahme [NPW02] erstmalige Verwendung des hier benutzten hochempfindlichen Photomultipliers ein weiterer Grund für die erfolgreiche Messung der Lumineszenz von intrazellulärem Singulett-Sauerstoff.

Über die intrazelluläre Abklingzeit des Singulett-Sauerstoffs existieren jedoch Abschätzungen, welche von $0,05 \mu\text{s}$ bis zu $0,5 \mu\text{s}$ [K91, BK92, PMW90] reichen und damit um mindestens eine Größenordnung niedriger liegen als die gemessenen Abklingzeiten. Bei diesen Abschätzungen wird jedoch davon ausgegangen, daß es sich bei Zellen um homogene Mischungen von Proteinen, Lipiden (v. a. Phosphatidylcholin) und weiteren zellulären Komponenten handelt. Im Gegensatz dazu handelt es sich aber bei Membranen, innerhalb derer Photofrin und damit auch Singulett-Sauerstoff lokalisiert ist, um ein heterogenes System, bestehend aus proteinfreien Bereichen und Bereichen mit hoher Protein-Konzentration, so daß bei ersteren die Detektion der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz mit der für Phosphatidylcholin typischen Abklingzeit auch zu erwarten war.

Analog zu den Lipidsuspensionen in H_2O ist außer der Abklingzeit des Singulett-Sauerstoffs in Phosphatidylcholin keine weitere Abklingzeit bestimmbar, insbesondere weder die des Singulett-Sauerstoffs in H_2O noch eine Abklingzeit, die auf eine Lokalisation des Singulett-Sauerstoffs in proteinreichen Bereichen der Plasmamembran hinweisen würde (siehe auch Kapitel 4.2).

Durch Zugabe von 50 mM Natriumazid läßt sich die Abklingzeit – soweit noch bestimmbar – auf $9 \pm 4 \mu\text{s}$ reduzieren. Im Falle einer Zugabe von 50 mM Histidin läßt sich nur noch in zwei Fällen eine Abklingzeit bestimmen, nämlich $11 \pm 4 \mu\text{s}$ sowie $8 \pm 4 \mu\text{s}$. In den anderen Fällen ist das detektierte Lumineszenzsignal zu schwach, um die Bestimmung einer Abklingzeit zu gestatten. Somit scheint hier zunächst das Histidin der stärkere Quencher zu sein, im Widerspruch zu Kapitel 4.1.1, wo die Quenchingratenkonstante von Natriumazid als um einen Faktor fünf größer bestimmt wurde als die von Histidin (siehe Tabelle 4.1 auf Seite 77). Jedoch ist für die Quenchingrate neben der Quenchingratenkonstante auch die Quencher-Konzentration entscheidend (vgl. Gleichung (2.16) auf Seite 28), so daß am Entstehungsort des Singulett-Sauerstoffs (Plasmamembran bei 90 Minuten, Membranen der Mitochondrien bei 24 Stunden Inkubationszeit) das Histidin wohl in entsprechend größeren Konzentrationen vorhanden sein dürfte, was u. a. mit dem hydrophilen Charakter des Natriumazids [PV79] zu erklären ist.

4.3.2.2 HT29 in D₂O-PBS

Abbildung 4.50 auf Seite 137 zeigt exemplarisch zwei Messungen der korrigierten Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz, generiert durch Laserbestrahlung von Photofrin-inkubierten HT29-Zellen in D₂O-PBS. Die Inkubationszeit betrug bei a) 90 Minuten, bei b) 24 Stunden. Wie man erkennt, ist das Abklingverhalten der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz innerhalb des experimentellen Rauschens bei a) mono-exponentiell mit einer Abklingzeit von $32 \pm 4 \mu\text{s}$, wohingegen bei b) ein bi-exponentielles Abklingen mit Abklingzeiten von $13 \pm 3 \mu\text{s}$ und $25 \pm 4 \mu\text{s}$ beobachtet werden konnte. Es sei jedoch ausdrücklich darauf hingewiesen, daß bei Verwendung von D₂O-PBS lediglich bei der Inkubationskonzentration von $5 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ und einer Inkubationsdauer von 24 Stunden ein bi-exponentielles Abklingen der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz zu beobachten war.

Tabelle 4.8 zeigt nun sämtliche Abklingzeiten der korrigierten Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz bei Photofrin-inkubierten HT29 suspendiert in D₂O-PBS für die verschiedenen Inkubationen ohne sowie mit Zugabe der Quencher Natriumazid (NaN₃) und Histidin.

Inkubations-zeit [Stunden]	Inkubations-konzentration [$\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$]	Abklingzeit ohne Quencher [μs]	Abklingzeit + 50 mM NaN ₃ [μs]	Abklingzeit + 50 mM Histidin [μs]
1,5	5	32 ± 4	–	–
1,5	20	36 ± 4	12 ± 4	13 ± 8
1,5	50	64 ± 2	6 ± 2	3 ± 2
24	5	13 ± 3 25 ± 4	7 ± 2	9 ± 2
24	20	45 ± 3	16 ± 3	–
24	50	41 ± 2	15 ± 3	–

Tabelle 4.8: Abklingzeiten der korrigierten Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz in HT29-Zellen suspendiert in D₂O-PBS;

–: Signal/Rausch-Verhältnis zu gering zur Bestimmung einer Abklingzeit

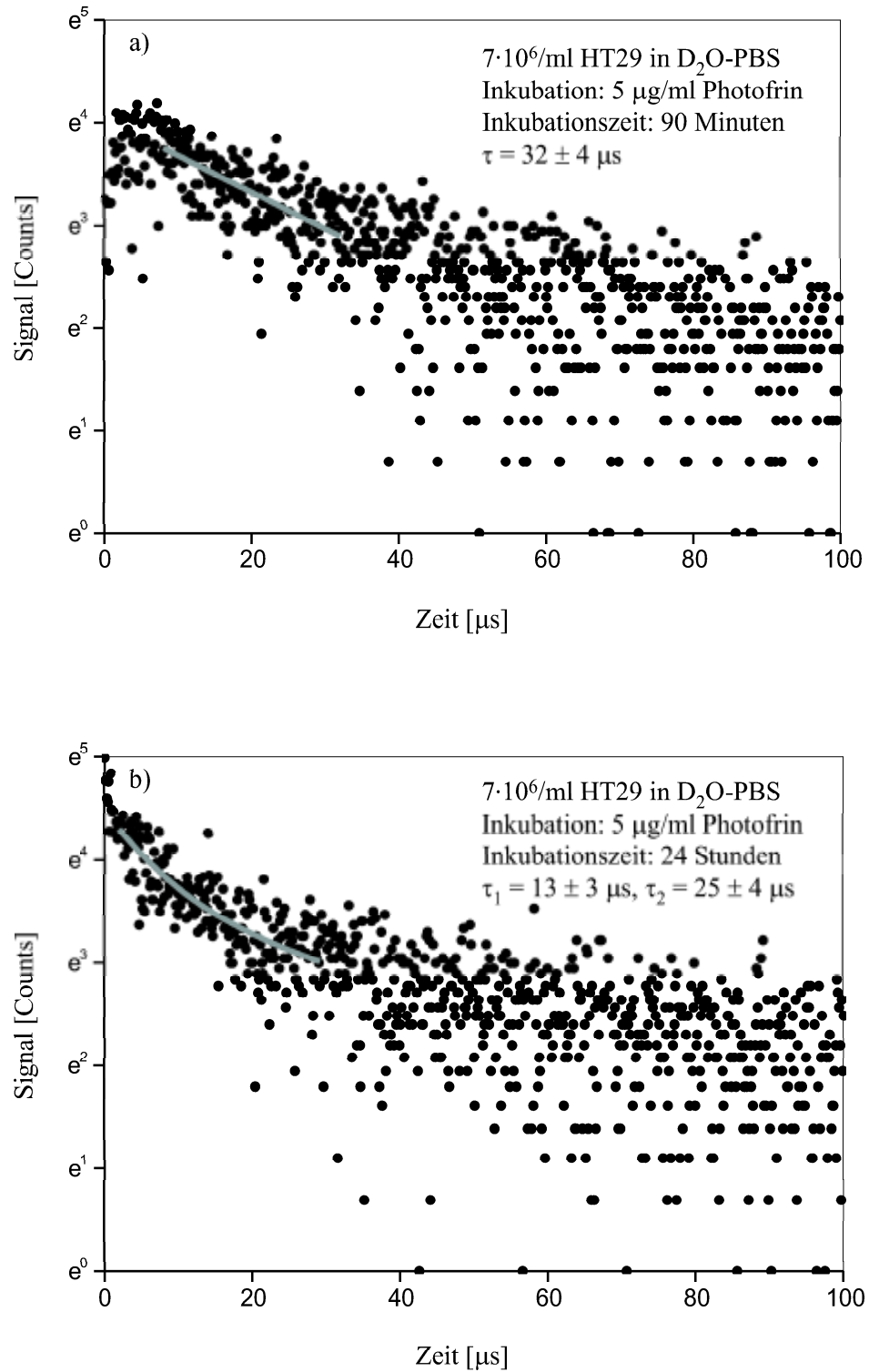


Abbildung 4.50: Exemplarische Einzelmessung der korrigierten Lumineszenz von Singulett-Sauerstoff generiert durch HT29-Zellen in D₂O-PBS bei einer Inkubation von 5 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ für 90 Minuten (a) bzw. für 24 Stunden (b)

Wie bereits erwähnt, ist lediglich eine einzige Abklingzeit bi-exponentiell, nämlich bei einer Inkubation von $5 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ für 24 Stunden. Hier ist die kürzere Abklingzeit mit $13 \pm 3 \mu\text{s}$ identisch mit der Abklingzeit des Singulett-Sauerstoffs in Phosphatidylcholin. Die längere Abklingzeit von $25 \pm 4 \mu\text{s}$ ist wesentlich kürzer als die Singulett-Sauerstoff-Abklingzeit in D_2O , was daran liegen dürfte, daß das gemessene Signal bei längeren Zeiten ein sehr geringes Signal/Rausch-Verhältnis aufweist, somit der bi-exponentielle Fit nicht bis zu genügend lange Zeiten durchgeführt werden kann und deshalb die bestimmte Abklingzeit aus der Übergangsregion zwischen den Anteilen am Anfang und am Ende der Lumineszenzabklingkurve stammt.

Die mono-exponentiellen Abklingzeiten bei allen anderen Inkubationen sind (mit Ausnahme der Inkubationszeit von 90 Minuten und einer Inkubationskonzentration von $50 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$) mit $32 \mu\text{s}$ bis $45 \mu\text{s}$ zum einen länger als die Abklingzeit in Phosphatidylcholin, zum anderen kürzer als die Abklingzeit in D_2O . Ähnliche Zeiten existieren bereits in der Literatur (z. B. [BK92, OSH97]). Hier handelt es sich um sog. Mischzeiten, bei denen es aufgrund des geringen Signal/Rausch-Verhältnisses nicht möglich war, das Meßsignal mit einem bi-exponentiellen Zerfall zu fitten. Die Signalbeiträge zu diesen Mischzeiten stammen zum einen von Singulett-Sauerstoff, der durch Diffusion Kontakt zu D_2O hat aber wieder innerhalb der Membranen relaxiert, so daß die Lipidzeit eine effektive Verlängerung erfährt. Zum anderen stellt man bei Betrachtung der beiden Signalbeiträge des in D_2O sowie des in den zellulären Membranen relaxierenden Singulett-Sauerstoffs fest, daß bei einer Überlagerung des Beitrags aus den Membranen mit einer Abklingzeit von $13 \mu\text{s}$ und des Beitrags aus dem D_2O mit einer Abklingzeit von $67 \mu\text{s}$ aufgrund des experimentellen Rauschens nur eine effektive Lipidzeit bestimmt werden kann, die größer als die echte Lipidzeit ist. Desweiteren kann ebenfalls nur eine effektive D_2O -Zeit bestimmt werden, die kürzer als die echte D_2O -Zeit ist, da ein bi-exponentieller Fit aufgrund des geringen Signal/Rausch-Verhältnisses nicht bis zu den dazu notwendigen langen Zeiten durchgeführt werden kann.

Im Falle einer Inkubation von $50 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ für 90 Minuten beträgt die Abklingzeit der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz $64 \pm 2 \mu\text{s}$. Dieser Wert ist im Rahmen des Fehlers identisch mit der Abklingzeit des Singulett-Sauerstoffs in reinem D_2O von $67 \pm 3 \mu\text{s}$ (siehe Tabelle 4.1 auf Seite 77). Zur Erklärung, weshalb bei dieser Inkubation die Abklingzeit der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz weder die Lipidzeit enthält noch eine Mischzeit ist, muß die Zellvitalität betrachtet werden (s. u.).

Bei Zugabe von Natriumazid zu D_2O -PBS-Zellsuspensionen lassen sich die gemessenen Abklingzeiten – soweit noch bestimmbar – auf $11 \pm 5 \mu\text{s}$ reduzieren. Bei Zugabe von Histidin ist nur noch in drei Fällen die Bestimmung der Abklingzeit möglich. Diese Werte schwanken zwischen $3 \mu\text{s}$ und $13 \mu\text{s}$. Insgesamt betrachtet scheinen bei Verwendung von D_2O -PBS und Quenchern die bestimmten Abklingzeiten stärker zu streuen als bei Verwendung von H_2O -PBS, was möglicherweise darauf zurückzuführen ist, daß D_2O die Abklingzeit des Singulett-Sauerstoffs massiv verlängert (verglichen mit H_2O) und die zugesetzten Quencher diese wieder verkürzen. Dabei ist aber die jeweilige Lokalisation von D_2O und Quencher innerhalb der Zelle zu beachten.

4.3.3 Zellvitalität

Um zu zeigen, daß die gemessene Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz tatsächlich aus intakten HT29-Zellen in Suspension stammt und nicht durch Bestrahlung von Photofrin generiert wurde, welches an den Membranen und Membranbruchstücken von toten Zellen lokalisiert ist, muß die Zellvitalität nach Messung der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz bestimmt werden.

4.3.3.1 90 Minuten Inkubationszeit

Abbildung 4.51 zeigt die gemessenen Zellvitalitäten bei einer Inkubation von 90 Minuten, d. h. bei einer subzellulären Lokalisation des Photofrins in den Plasmamembranen, in Abhängigkeit der Inkubationskonzentration.

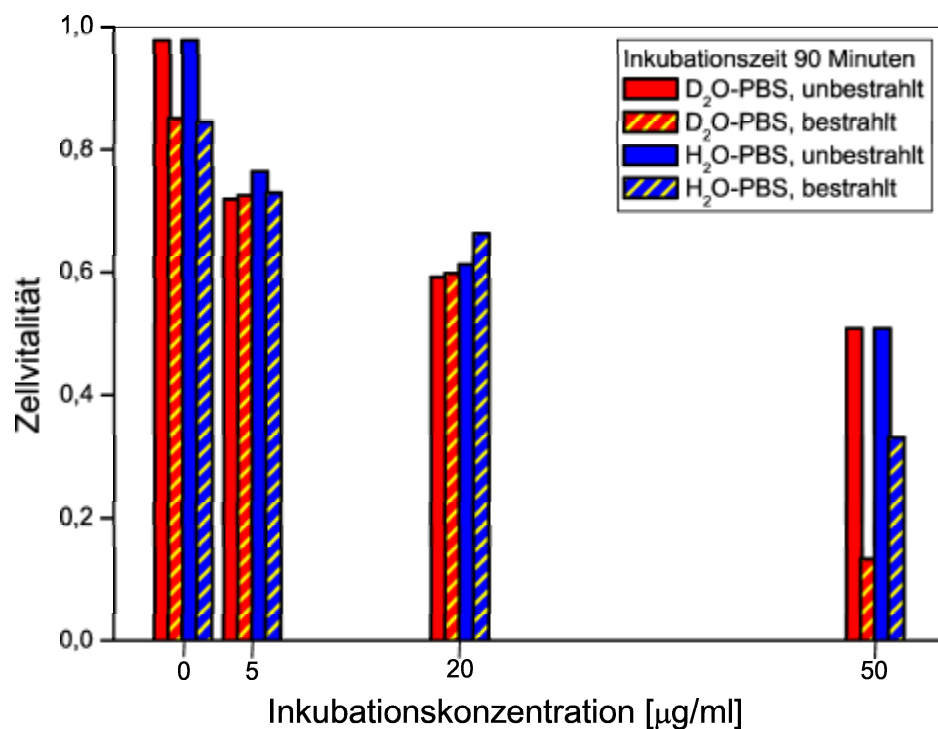


Abbildung 4.51: Vitalität der HT29-Zellen suspendiert in H₂O-PBS und D₂O-PBS bei einer Inkubationszeit von 90 Minuten in Abhängigkeit der Inkubationskonzentration

Wie zu erkennen ist, nimmt die Zellvitalität bei den unbestrahlten Suspensionen mit steigender Photofrin-Inkubationskonzentration ab, was auf die Dunkeltoxizität des Photofrins zurückzuführen ist. Für die Inkubationskonzentrationen von 5 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ sowie

$20 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ ist sowohl in H_2O -PBS wie auch in D_2O -PBS innerhalb der Meßgenauigkeit von etwa $\pm 0,1$ kein Unterschied in der Zellvitalität zwischen unbestrahlten und bestrahlten Zellsuspensionen festzustellen. Dies bedeutet, daß bei diesen Inkubationskonzentrationen die Generierung von Singulett-Sauerstoff in der Plasmamembran der Zellen keine oder lediglich subletale Schäden verursacht.

Jedoch ist bei der hohen Inkubationskonzentration von $50 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ sowohl bei Verwendung von H_2O -PBS wie auch D_2O -PBS die Zellvitalität deutlich erniedrigt. Dies ist in D_2O -PBS stärker ausgeprägt als in H_2O -PBS, was darauf hindeutet, daß der in der Plasmamembran entstehende Singulett-Sauerstoff einen sehr guten diffusionsvermittelten Kontakt zum umgebenden Lösungsmittel hat (woraus auch die lange gemessene Abklingzeit von $64 \pm 2 \mu\text{s}$ bei Verwendung von D_2O -PBS resultiert), da bei einer längeren Abklingzeit des Singulett-Sauerstoffs die Wahrscheinlichkeit für ein einzelnes Singulett-Sauerstoff-Molekül steigt, eine Zelle durch chemisches Quenchen zu schädigen. Weshalb hier bei Verwendung von D_2O -PBS trotz der offensichtlich starken Schädigung der Zellen durch Singulett-Sauerstoff und damit der häufig stattfindenden Prozesse des chemischen Quenchens eine Abklingzeit gemessen wird, die nahezu gleich der in reinem D_2O -PBS ist, ist unklar.

4.3.3.2 24 Stunden Inkubationszeit

Abbildung 4.52 auf Seite 141 zeigt die gemessenen Zellvitalitäten bei einer Inkubation von 24 Stunden, d. h. bei einer subzellulären Lokalisation des Photofrins in den Membranen der Mitochondrien, in Abhängigkeit der Inkubationskonzentration. Analog zur Inkubationszeit von 90 Minuten nimmt die Zellvitalität bei den unbestrahlten Suspensionen mit steigender Photofrin-Inkubationskonzentration ab, was wieder auf die Dunkeltoxizität des Photofrins zurückzuführen ist. Hier ist lediglich bei einer Inkubationskonzentration von $5 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ kein Unterschied in der Zellvitalität zwischen unbestrahlten und bestrahlten Zellsuspensionen festzustellen, dies sowohl in H_2O -PBS wie auch in D_2O -PBS. Dies bedeutet, analog zur Inkubationszeit von 90 Minuten bei Inkubationskonzentrationen von 5 und $20 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ (s. o.), daß hier durch die Generierung von Singulett-Sauerstoff in den Mitochondrien lediglich subletale Schäden gesetzt werden. Bereits bei einer Inkubationskonzentration von $20 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ ist die Zellvitalität der bestrahlten Zellen verglichen mit den unbestrahlten deutlich reduziert, jedoch ist hier bei einer Inkubationszeit von 24 Stunden nahezu kein Unterschied zwischen H_2O -PBS und D_2O -PBS festzustellen, was auf einen vernachlässigbaren diffusionsvermittelten Kontakt des Singulett-Sauerstoffs zum jeweiligen Lösungsmittel hindeutet. Offensichtlich dringt sehr wenig D_2O -PBS in die Zellen ein und bis zu den Mitochondrien vor. Ein Kontakt des in den Mitochondrien erzeugten Singulett-Sauerstoffs zum Zelläußeren (H_2O -PBS bzw. D_2O -PBS) ist bei der geringen intrazellulären Diffusionsreichweite des Singulett-Sauerstoffs von wenigen Nanometern [BK92] auch nicht zu erwarten. Bei einer Inkubationskonzentration von $50 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ lassen sich aufgrund der hohen Dunkeltoxizität des Photofrins keine Aussagen mehr treffen.

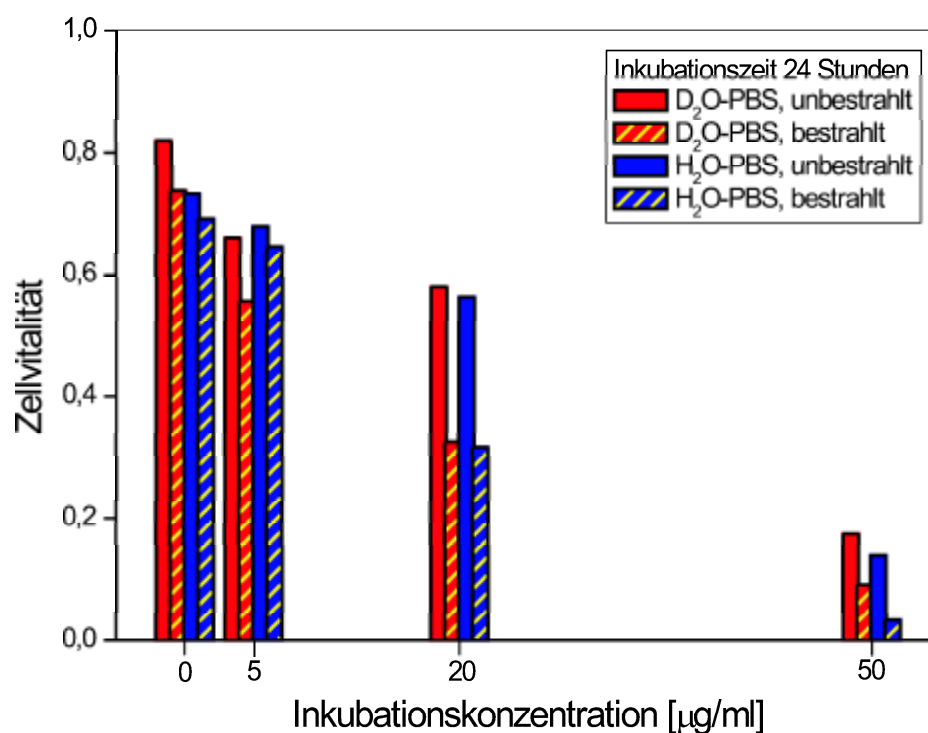


Abbildung 4.52: Vitalität der HT29-Zellen suspendiert in H₂O-PBS und D₂O-PBS bei einer Inkubationszeit von 24 Stunden in Abhängigkeit der Inkubationskonzentration

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß bis zu einer Inkubationskonzentration von 20 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ die gemessene Lumineszenz des Singulett-Sauerstoffs auf die strahlende Relaxation von Singulett-Sauerstoff-Molekülen in oder an lebenden Zellen zurückzuführen ist und nicht auf Singulett-Sauerstoff, der in oder an toten Zellen oder gar Zellbestandteilen in Suspension generiert wurde.

4.3.3.3 Quencher

Abbildung 4.53 zeigt nun die gemessenen Zellvitalitäten bei Verwendung von H_2O -PBS bei einer Inkubation von $50 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ für 90 Minuten (a) und bei einer Inkubation von $20 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ für 24 Stunden (b).

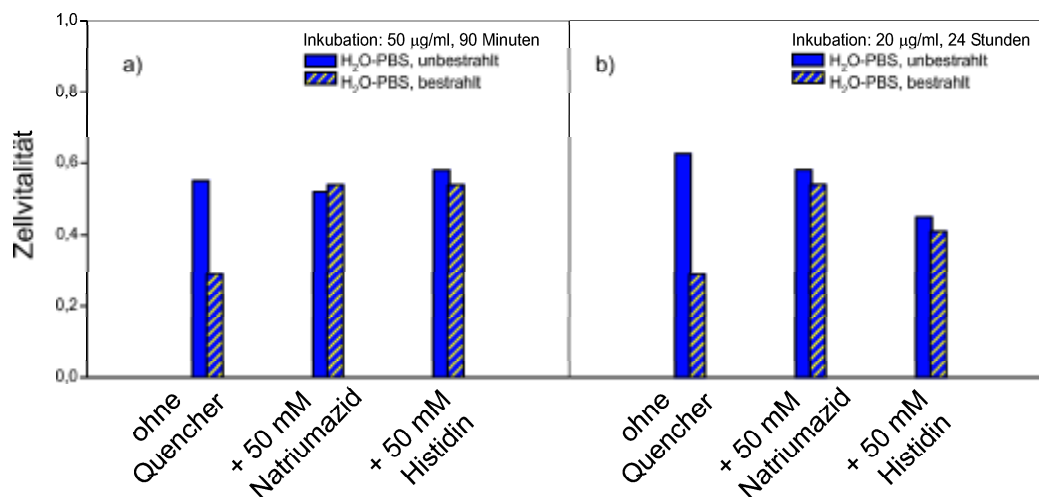


Abbildung 4.53: Vitalität der HT29-Zellen suspendiert in H_2O -PBS $50 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ für 90 Minuten (a) und bei einer Inkubation von $20 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ für 24 Stunden (b)

Wie zu erkennen ist, läßt sich durch die Zugabe von Natriumazid wie auch Histidin über eine Verkürzung der Singulett-Sauerstoff-Lebensdauer (siehe Tabelle 4.7 auf Seite 134) die Zellvitalität der laserbestrahlten Zellen innerhalb der Meßgenauigkeit auf den Wert der unbestrahlten heben. Dieses Verfahren, in Kombination mit der Verwendung von D_2O -PBS, entspricht im übrigen der indirekten Nachweismethode des Singulett-Sauerstoffs im Rahmen von Zellkulturexperimenten.

Zusammenfassung

Unter den reaktiven Sauerstoffspezies, die durch lichtaktivierte Photosensibilisatoren im Rahmen von Photochemotherapien erzeugt werden, spielt der Singulett-Sauerstoff entweder eine zentrale Rolle, z.B. bei der photodynamischen Therapie, oder ist zumindest, wie bei der PUVA-Therapie, für einige Nebenwirkungen verantwortlich. Die Aufklärung der photophysikalischen Vorgänge im Rahmen der Wechselwirkung zwischen Photosensibilisator und Sauerstoff ist von grundlegender Bedeutung für das Verständnis der Singulett-Sauerstoff-Generierung und deren Auswirkungen bei Photochemotherapien. Dazu wurde die zeitaufgelöste Detektion der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz bei 1270 nm verwendet. Zum Einsatz kam ein hochempfindlicher Infrarot-Photomultiplier mit hervorragendem Signal/Rausch-Verhältnis. In Verbindung mit einer schnellen Zählleinrichtung wurde zusätzlich eine Zeitauflösung von etwa 10 ns erreicht, so daß das verwendete Detektionssystem bezüglich der zeitaufgelösten Messung der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz eine entscheidende Verbesserung darstellt. Dadurch konnten zunächst grundlegende photophysikalische Untersuchungen der Wechselwirkung zwischen einer Reihe von Photosensibilisatoren und molekularem Sauerstoff durchgeführt werden. Desweiteren wurde auch die Detektion von intrazellulärem Singulett-Sauerstoff *in vitro* möglich. Im folgenden seien nun die wichtigsten Ergebnisse hinsichtlich Erzeugung und Relaxation von Singulett-Sauerstoff in homogenen Lösungen, heterogenen Suspensionen und *in vitro* zusammengefaßt.

Homogene Lösungen

Im Rahmen der Untersuchungen zu den photophysikalischen Grundlagen der Erzeugung und Relaxation von Singulett-Sauerstoff wurden insgesamt fünf Photosensibilisatoren verwendet, darunter das für die PUVA-Therapie klinisch zugelassene Medikament 8-Methoxypsoralen (8-MOP) und das Protoporphyrin IX (als Dimethylester, PPIX-DME), welches als eigentlicher, endogener Photosensibilisator bei der Verwendung von 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) zur Photodynamischen Therapie gilt. Desweiteren wurden ATMPn, ein Porphycen, das sich in der Phase II der klinischen Zulassung befindet, verwendet wie auch Bengalrosa. Letzteres besitzt zwar keinerlei klinische Bedeutung, wurde aber in der Literatur sehr häufig als Singulett-Sauerstoff-Generator verwendet,

so daß es deshalb zur Abschätzung der Leistungsfähigkeit des verwendeten Detektionssystems, wie auch aufgrund der guten Löslichkeit in wäßriger und alkoholischer Umgebung, Eingang in die Untersuchungen fand. Als Lösungsmittel wurden schweres Wasser (D_2O) und deuteriertes Ethanol ($EtOD$) verwendet.

Bei diesen vier Photosensibilisatoren zeigte sich, daß der durch sie erzeugte Singulett-Sauerstoff in seinem zeitlichen Verhalten sehr gut durch ein – verglichen mit dem bisherigen Standardmodell – erweitertes Differentialgleichungssystem beschrieben werden kann. Durch die Variation der Parameter Photosensibilisator-, Sauerstoff- und Quencher-Konzentration konnten sämtliche relevanten Raten und Ratenkonstanten bestimmt werden. Im Falle des PPIX-DMEs, bei welchem als einziger Photosensibilisator ein Rücktransfer von Energie vom Singulett-Sauerstoff zum Triplett- T_1 -Zustand des Photosensibilisators auftrat, konnten die Raten und Ratenkonstanten lediglich abgeschätzt werden. Insbesondere fand im Rahmen der vorliegenden Arbeit, verglichen mit der bisherigen Literatur, erstmalig die Messung und die definierte Variation der Sauerstoff-Konzentration statt, so daß dadurch zum einen die Ratenkonstante der sauerstoff-induzierten Relaxation des Photosensibilisator-Triplett- T_1 -Zustandes bei der zeitaufgelösten Messung der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz experimentell zugänglich wurde, zum anderen auch die Entwicklung der Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute, der zentralen Eigenschaft eines Photosensibilisators im Hinblick auf die photodynamische Therapie, beim Übergang zu den niedrigen *in vivo*-relevanten Sauerstoff-Konzentrationen gezeigt werden konnte. Die beiden verwendeten Quencher Natriumazid und Histidin zeigten in Bezug auf den Singulett-Sauerstoff die erwartete, nämlich abklingzeitverkürzende Wirkung, wobei sich das Natriumazid als wirksamer herausstellte. Ebenso konnte gezeigt werden, daß das Natriumazid bei den beiden Singulett-Sauerstoff-Generatoren Bengalrosa und PPIX-DME einen effektiven Deaktivator des Triplett- T_1 -Zustandes darstellt.

Bei der Verwendung von Indocyaningrün-Natriumiodid (ICG-NaI) hingegen, welches in der Literatur auf der Basis von Zellkulturexperimenten als Typ II-Photosensibilisator beschrieben wurde, also durch die Generation von Singulett-Sauerstoff wirken soll, konnte zwar in homogenen Lösungen eine Lumineszenz bei 1270 nm gemessen werden, jedoch ließ das Verhalten der gemessenen Signale bei Zugabe des Singulett-Sauerstoff-Quenchers Natriumazid bzw. bei Variation der Sauerstoff-Konzentration den Schluß zu, daß die gemessene Lumineszenz nicht von Singulett-Sauerstoff stammt. Dessen Herkunft blieb unklar.

Jedoch offenbarte sich am Beispiel des ICG-NaI der eigentliche Wert des direkten Nachweises des Singulett-Sauerstoffs durch seine Lumineszenz bei 1270 nm. Chromatographische Untersuchungen zeigten nämlich, daß ICG-NaI zwar durchaus Singulett-Sauerstoff generiert, dieser aber sofort das ICG-NaI-Molekül oxidiert und somit zunächst weder mit ICG-NaI inkubierte Zellen schädigen kann noch durch Lumineszenzmessungen nachweisbar ist. Die dadurch gebildeten Zerfallsprodukte erwiesen sich aber in Zellkulturexperimenten als zelltoxisch, so daß die Diskrepanz zwischen den Zellkulturversuchen, die ICG-NaI als Typ II-Photosensibilisator beschrieben haben, und

dem mißglückten Versuch der Detektion der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz zur Entdeckung einer bisher nicht beschriebenen photodynamischen Reaktion führte.

Lipidsuspensionen

Durch die zeitaufgelöste Messung der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz an Suspensionen des Lipids Phosphatidylcholin – eines der Hauptbestandteile zellulärer Membranen – in Wasser (H_2O) bzw. schwerem Wasser (D_2O), welche mit dem Photosensibilisator Photofrin in unterschiedlichen Konzentrationen versetzt waren, wurde zunächst die Abklingdauer von Singulett-Sauerstoff in Phosphatidylcholin zu $12 \pm 2 \mu\text{s}$ ermittelt. Für diese existiert in der bisherigen Literatur lediglich eine Abschätzung. Aufgrund des bi-exponentiellen Abklingverhaltens von Singulett-Sauerstoff in Suspensionen von Phosphatidylcholin in D_2O konnte auch gezeigt werden, daß in heterogenen Suspensionen die Abklingdauer des Singulett-Sauerstoffs prinzipiell multi-exponentiell ist, wobei die Ordnung des exponentiellen Abklingens gleich der Anzahl der mikroskopischen Umgebungen ist (im vorliegenden Fall Lipid und D_2O).

In Suspensionen von Phosphatidylcholin in H_2O war jedoch aufgrund eines zu schwachen Beitrags von Singulett-Sauerstoff in H_2O zur gesamten gemessenen Lumineszenzintensität lediglich das mono-exponentielle Abklingverhalten des Lipidbeitrags festzustellen. Bei Zunahme der Konzentrationen an Photofrin, Natriumazid und Histidin in Lipidsuspensionen konnte – anders als nach den Ergebnissen in Lösungen zu erwarten – keine Verkürzung der Abklingzeit des Singulett-Sauerstoffs in den Phosphatidylcholintröpfchen gemessen werden. Im Falle des Photofrins ist dies durch eine sehr schnelle Photofrin-Sättigung der Lipidtröpfchen bedingt, im Falle der Quencher durch ein sehr geringes Vermögen, in die Lipidtröpfchen einzudringen.

In vitro Experimente

Im Rahmen der *in vitro* Experimente wurden HT29-Zellen verwendet, die einen relativ geringen Gehalt an stark quencheden Proteinen und damit einen relativ hohen Gehalt an schwach quencheden Lipiden aufweisen, was den Nachweis von Singulett-Sauerstoff aus Lipidumgebungen ermöglichte.

Bezüglich der subzellulären Lokalisation des im Rahmen der *in vitro* Experimente verwendeten Photosensibilisators Photofrin konnten mit Hilfe von fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen unabhängig von der Photofrin-Inkubationskonzentration (5, 20, 50 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$) zwei Fälle unterschieden werden: Bei einer Inkubationszeit von 1,5 Stunden ist Photofrin in der Plasmamembran der HT29-Zellen lokalisiert und bei 24 Stunden Inkubationszeit in den Membranen der Mitochondrien. Somit kann im ersten Fall von einem stärkeren diffusionsvermittelten Kontakt des Singulett-Sauerstoffs zum umge-

benden Medium H₂O-PBS bzw. D₂O-PBS) ausgegangen werden als im letzteren.

Bei den hohen Inkubationskonzentrationen von 50 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ bzw. 20 und 50 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ wurde die Zellvitalität bereits durch die Dunkeltoxizität des Photofrins erniedrigt. Somit ist von einem Eindringen des jeweiligen Mediums in die geschädigten Zellen auszugehen, so daß auch bei einer Inkubationszeit von 24 Stunden der im Zellinneren erzeugte Singulett-Sauerstoff Kontakt zum verwendeten Medium haben kann.

Die Bestimmung der Singulett-Sauerstoff-Abklingdauer in Phosphatidylcholin in den Lipidsuspensionen erwies sich als Schlüssel zur Interpretation der mit Zellsuspensionen gemessenen Lumineszenzsignale. Bei Verwendung von HT29-Zellen in H₂O-PBS waren die Abklingzeiten des gemessenen Lumineszenzsignals unabhängig von der Photofrin-Inkubationskonzentration und -zeit. Der Mittelwert betrug $16 \pm 4 \mu\text{s}$ und ist damit im Rahmen des Meßfehlers identisch mit der Singulett-Sauerstoff-Abklingdauer von $12 \pm 2 \mu\text{s}$ in reinem Phosphatidylcholin. Somit wurde also – verglichen mit der bisherigen Literatur erstmalig – intrazellulärer Singulett-Sauerstoff durch seine Lumineszenz bei 1270 nm nachgewiesen. Eine Signalkomponente aus dem umgebenden H₂O-PBS mit einer erwarteten Abklingzeit von etwa $3 \mu\text{s}$ konnte nicht beobachtet werden, da die Konzentration an Singulett-Sauerstoff in H₂O-PBS zu gering war.

Bei Verwendung von HT29-Zellen in D₂O-PBS konnte für eine Inkubationszeit von 24 Stunden und der kleinsten Photofrin-Inkubationskonzentration von 5 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ ein bi-exponentielles Abklingen der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz beobachtet werden. Die mit $13 \pm 3 \mu\text{s}$ kürzere der beiden Abklingzeiten wurde dem intrazellulären Singulett-Sauerstoff zugeordnet, die zweite Signalkomponente dem Singulett-Sauerstoff in D₂O-PBS. Bei allen anderen Inkubationszeiten und -konzentrationen wurde die Signalkomponente von intrazellulärem Singulett-Sauerstoff durch die Signalkomponente von Singulett-Sauerstoff in D₂O-PBS überlagert und es ergaben sich Abklingzeiten zwischen 25 und 64 μs . Letztere ist nahezu identisch mit der erwarteten Singulett-Sauerstoff-Abklingdauer in reinem D₂O-PBS. Diese Überlagerung ist entweder auf das Eindringen von D₂O-PBS in die Zellen bedingt durch eine erniedrigte Zellvitalität oder aber auf den diffusionsvermittelten Kontakt des Singulett-Sauerstoffs zum D₂O-PBS bedingt durch die Lokalisation des Photofrins in der Plasmamembran zurückzuführen.

Somit konnten die mit HT29-Suspensionen gemessenen Singulett-Sauerstoff-Abklingdauern interpretiert werden. Der Nachweis von intrazellulärem Singulett-Sauerstoff stellt im Vergleich mit der bisherigen Literatur ein absolutes Novum dar.

Mit der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß das beschriebene, neuartige Detektionssystem eine wesentliche Verbesserung für den direkten, lumineszenzspektroskopischen Nachweis des Singulett-Sauerstoffs darstellt. Es kann damit als derzeit mächtigstes Werkzeug zum Verständnis der primären physikalischen Prozesse bei der Singulett-Sauerstoff-Generierung angesehen werden und stellt einen Meilenstein auf dem Weg zum Verständnis der primären intrazellulären Prozesse im Rahmen der Singulett-Sauerstoff-Erzeugung bei der Photochemotherapie dar.

Anhang A

Präparation der Zellsuspensionen

Die verwendeten HT29-Zellen wurden an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie in Gewebekulturschalen (Falcon, Franklinlakes, USA) unter Standardkulturbedingungen (37 °C, 8 % CO₂ in H₂O-gesättigter Atmosphäre) in sterilen Brutschränken gezüchtet. Als Kulturmedium wurde Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma) unter Zusatz von 10% fötalem Kälberserum (Sigma), 1% L-Glutamin und 1% Streptomycin/Penicillin (Gibco, Eggenstein) eingesetzt. Ein Mediumwechsel erfolgte in regelmäßigen Abständen dreimal pro Woche. Als Photosensibilisator wurde Photofrin (Sanofi) verwendet. Die Inkubation erfolgte in Konzentrationen von 5 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$, 20 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ und 50 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ im Überstand aus DMEM für Zeitdauern von 90 Minuten und 24 Stunden. Zur Zellernte wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen mit einer phosphatgepufferten, physiologischen Salzlösung (PBS), bestehend aus 9,55 $\frac{\text{g}}{\text{l}}$ NaCl und einiger anderer Ionen (Biochrom, Berlin) in H₂O, gespült. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen mit 0.05 % Trypsin/0.02 % Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, Gibco) in PBS für wenige Minuten bei 37 °C, wodurch ein Ablösen vom Kulturflaschenboden erreicht wird. Die Trypsinaktivität wurde durch Zugabe von DMEM abgestoppt. Zur Trennung der abgelösten Zellen vom Überstand wurde dieser samt den abgelösten Zellen mit einer Pipette abgenommen. Nach Zentrifugation mit 1200 min⁻¹ für fünf Minuten wurde erneut der Überstand abgesaugt. Die Bestimmung der Gesamtzahl der so erhaltenen Zellen erfolgte unter Verwendung eines Lichtmikroskops und einer Neubauer-Zählkammer nach Zugabe eines definierten Volumens (20 ml) DMEM. Die Standardkonzentration von 7,5·10⁶ inkubierten Zellen pro Milliliter Suspension wurde durch erneutes Absaugens des DMEM und anschließender Zugabe eines entsprechenden Volumens PBS, oder phosphatgepufferten, physiologischer Salzlösung unter Verwendung von D₂O anstatt H₂O, erhalten.

Anhang B

Henry'sches Gesetz

Nach dem Henry-Gesetz gilt für den Partialdampfdruck, d. h. die Fugazität π_{fl} eines in Lösung gegangenen Gases [MH73]:

$$\pi_{\text{fl}} = \frac{c_{\text{fl}}}{k_{\text{H}}} \quad (\text{B.1})$$

Hierbei ist c_{fl} die Konzentration des Gases in der flüssigen Phase und k_{H} die Henry-Konstante, welche vom Lösungsmittel, vom Gas selbst wie auch von der Temperatur abhängt. Somit erkennt man, daß sich bei bekanntem Partialdampfdruck sofort die Konzentration des gelösten Gases ermitteln läßt.

Befindet sich nun ein in Lösung gegangenes Gas im Gleichgewicht mit der darüberliegenden Atmosphäre, so gilt außerdem [MH73]:

$$c_{\text{fl}} = k_{\text{H}}\pi_{\text{g}} \quad (\text{B.2})$$

Hierbei bezeichnet π_{g} den Partialdruck des Gases in der über der Flüssigkeit liegenden Atmosphäre. Somit gilt also im Gleichgewicht $\pi_{\text{fl}} = \pi_{\text{g}}$.

Die Temperaturabhängigkeit von k_{H} ist gegeben durch

$$k_{\text{H}}(T) = k_{\text{H}}(T_0) \exp \left[\frac{-\Delta_{\text{L}}H}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right) \right] \quad (\text{B.3})$$

wobei $\Delta_{\text{L}}H$ die Enthalpie der Lösung, d. h. die Differenz der Enthalpien des Gases in der Gasphase und in der flüssigen Phase, T die Temperatur und $T_0 = 298,15$ K ist [S99]. Aus (B.3) folgt:

$$\frac{-\Delta_{\text{L}}H}{R} = \frac{d \left[\ln \left(\frac{k_{\text{H}}(T)}{k_{\text{H}}(T_0)} \right) \right]}{d \left(\frac{1}{T} \right)} \quad (\text{B.4})$$

Tabelle B.1 gibt einige gemessene Werte von $k_H(T_0)$ und $\frac{d\left[\ln\left(\frac{k_H(T)}{k_H(T_0)}\right)\right]}{d\left(\frac{1}{T}\right)}$ für die Löslichkeit von gasförmigem Sauerstoff in Wasser. Man sieht, daß die Werte für $k_H(T)$ nur wenig streuen, während für $\frac{d\left[\ln\left(\frac{k_H(T)}{k_H(T_0)}\right)\right]}{d\left(\frac{1}{T}\right)}$ deutlich unterschiedliche Werte angegeben werden.

$k_H(T_0)$ $\left[\frac{\text{M}}{\text{atm}}\right]$	$\frac{d\left[\ln\left(\frac{k_H(T)}{k_H(T_0)}\right)\right]}{d\left(\frac{1}{T}\right)}$ [K]	Lit.
$1,3 \cdot 10^{-3}$	1700	[L28]
$1,2 \cdot 10^{-3}$	1800	[C66]
$1,3 \cdot 10^{-3}$	1500	[W77]
$1,3 \cdot 10^{-3}$	1700	[D92]
$1,3 \cdot 10^{-3}$	1500	[LF95]
$1,2 \cdot 10^{-3}$	1700	[KT80]

Tabelle B.1: Literaturdaten zur Henry-Konstante und deren Temperaturabhängigkeit von Sauerstoff gelöst in Wasser

Abbildung B.1 auf Seite 151 gibt nochmals einen Überblick über die Konzentration von in Wasser gelöstem Sauerstoff als Funktion von Partialdampfdruck π_{fl} – bei Vorliegen eines Gleichgewichts zwischen Atmosphäre und Lösung kann hier auch der Partialdruck π_{g} gesetzt werden – und Temperatur, berechnet nach (B.1), (B.3) und (B.4). Man erkennt den linearen Zusammenhang zwischen der Sauerstoffkonzentration c_{fl} in der flüssigen Phase und dem Partialdampfdruck sowie eine nichtlineare Abhängigkeit der Sauerstoffkonzentration c_{fl} von der Temperatur, welche aber erst bei hohen Sauerstoffpartialdampfdrücken stark zur Geltung kommt.

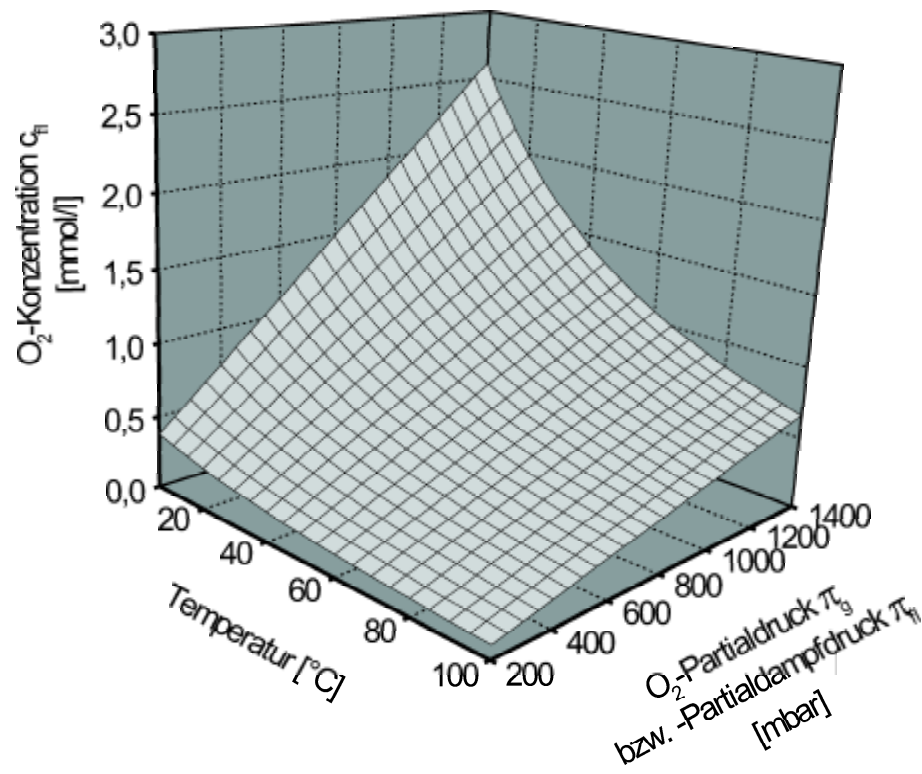


Abbildung B.1: Sauerstoff-Konzentration c_H in Wasser als Funktion der Temperatur T und des Partialdampfdrucks π_H bzw. im Gleichgewicht auch des Partialdrucks π_g , berechnet nach (B.1) bis (B.4). Hierbei wurde $k_H(T_0) = 1,3 \cdot 10^{-3} \frac{\text{M}}{\text{atm}}$ und $\frac{d[\ln(\frac{k_H(T)}{k_H(T_0)})]}{d(\frac{1}{T})} = 1500 \text{ K}$ gesetzt.

Anhang C

Meßprinzipien zur Bestimmung des Sauerstoffgehalts

C.1 Sauerstoff-Polarographie

Bei der O₂-Polarographie wird in einer wässrigen Elektrolytlösung Sauerstoff an einer Edelmetallkathode über H₂O₂ zu Hydroxylionen reduziert. Die Anode wird aus einem pO₂-indifferenten Material gewählt. Die kathodische O₂-Reduktion wird durch eine sog. Polarisationsspannung zwischen Anode und Kathode (typischerweise 400-850 mV) in Gang gehalten. Der Strom in diesem polarographischen Meßkreis ist zum pO₂ im Meßmedium linear proportional, falls zwischen der Kathode und dem Meßmedium eine sauerstoffdurchlässige Membran angeordnet ist, deren O₂-Diffusionsleitfähigkeit klein gegenüber der des Meßmediums ist [SG78]. Als Diffusionsleitfähigkeit wird der sog. Kroghsche Diffusionskoeffizient bezeichnet, der den Fickschen Diffusionskoeffizienten im ersten Fickschen Gesetz beim Übergang von Konzentrationsdifferenzen zu Partialdruckdifferenzen ersetzt.

Die zur polarographischen Messung des Sauerstoffpartialdampfdrucks verwendeten Sensoren sind sog. Clark-Typ-Sensoren. Bei ihnen liegen die polarographische Anode und die Kathode in einem gemeinsamen Elektrolytraum, der vom Meßmedium durch eine O₂-durchlässige, aber für Ionen undurchlässige Membran getrennt ist. Die polarographische Empfindlichkeit der hier verwendeten Sensoren ist ca. 0,8 nA/mmHg (bei 37 °C). Der polarographische Sondenstrom ist stark temperaturabhängig (etwa 4%/°C), somit muß gleichzeitig die Temperatur des Meßmediums gemessen werden, um eine eventuell vorhandene Temperaturdifferenz zwischen dem Meßmedium und demjenigen Medium, welches zur Kalibration der Sonde benutzt wurde, auszugleichen. Dies geschieht mit Hilfe eines Thermoelementes. Diese Temperaturdaten werden ebenfalls für die Umrechnung des Sauerstoffpartialdampfdrucks in die O₂-Konzentration mit Hilfe des Henry-Gesetzes benötigt.

C.2 Faseroptische Messung der Sauerstoff-Konzentration

Hier basiert das Meßprinzip auf dem Effekt der Lumineszenzlöschung bestimmter Luminophore (Indikatoren) durch molekularen Sauerstoff und der damit verbundenen Änderung des Lumineszenzsignals. Der faseroptische Aufbau besteht im wesentlichen aus einer LED zur Anregung des optischen Sensors, einem Glasfaserkabel zur Lichtleitung und einem Photomultiplier zur Detektion der Lumineszenz des optischen Sensors. Dieser Sensor dient als Indikator und ist am Ende der Glasfaser in eine Matrix eingebettet. Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Gerät „Microx TX“ mißt die Lumineszenzabklingzeit der immobilisierten Luminophore als sauerstoffabhängigen Parameter unter Verwendung der Phasen-Modulationsmethode. Hierbei wird die Fluoreszenz des Indikators mit sinusförmig moduliertem Licht angeregt, wobei die Lumineszenzabklingzeit des Indikators eine zeitliche Verzögerung des Emissionslicht verursacht. Aus dieser zeitlichen Verschiebung um einen Phasenwinkel läßt sich die mittlere Abklingzeit bestimmen und daraus der Sauerstoffgehalt in %-Luftsättigung [P01b].

Literaturverzeichnis

- [A01a] B. M. Aveline,
Primary Processes in photosensitization mechanisms, in:
P. Calzavara-Pinton, R.-M. Szeimies, B. Ortel (Edts.),
Photodynamic Therapy and Fluorescence Diagnosis in Dermatology, Kap. 2,
Elsevier, Amsterdam (2001).
- [A01b] G. Ackermann,
Photophysikalische Grundlagen der Fluoreszenzdiagnostik von Tumoren der
Haut, Dissertation, Universität Regensburg, Kap. 2 (2001).
- [ACD83] A. Andreoni, R. Cubeddu, S. De Silvestri, G. Jori, P. Laporta, E. Reddi,
Time-resolved fluorescence studies of hematoporphyrin in different solvents,
Z. Naturforsch. 38c, 83 (1983).
- [ACD85] A. Andreoni, R. Cubeddu, F. Dall'Acqua, C.N. Knox, T.G. Truscott,
Fluorescence lifetimes of furocoumarins. Psoralens, Chem. Phys. Lett. 114,
329 (1985).
- [ADL82] A. Andreoni, S. De Silvestri, P. Laporta, G. Jori, E. Reddi,
Hematoporpharin derivative: experimental evidence for aggregated species,
Chem. Phys. Lett. 88, 33 (1982).
- [AKB98] C. Abels, S. Karrer, W. Bäuml, M. Landthaler, R.-M. Szeimies,
Indocyanine green and laser light for the treatment of AIDS-associated cu-
taneous Kaposi's sarcoma, Brit. J. Canc. 77, 1021 (1998).
- [ALF85] E.M. Alderman, R.R. Lobb, J.W. Fett, J.F. Riordan, J.L. Bethune,
B.L. Vallee,
Angiogenic activity of human tumor plasma membrane components, Bio-
chem. 24, 7866 (1985).
- [ANF01] L. F. Agnez-Lima, R. L. Napolitano, R. P. P. Fuchs, P. Di Mascio, A. R. Muo-
tri, C. F. M. Menck,
DNA repair and sequence context affect $^1\text{O}_2$ -induced mutagenesis in bacte-
ria, Nucleic Acids Res. 29, 2899 (2001).

- [ARN96] P.F. Aramendia, R.W. Redmond, S. Nonell, W. Schuster, S.E. Braslavsky, K. Schaffner, E. Vogel,
The photophysical properties of porphycenes: Potential photodynamic therapy agents, *Photochem. Photobiol.* 44, 555 (1986).
- [ART96] K. Arakane, A. Ryu, K. Takarda, T. Masunga, K. Shinmoto, R. Kobayashi, S. Mashiko, T. Nagano, M. Hirobe,
Measurement of 1268 nm Emission for Comparison of Singlet Oxygen ($^1\Delta_g$) Production Efficiency of Various Dyes, *Chem. Pharm. Bull.* 44, 1 (1996).
- [ASS97] C. Abels, R.-M. Szeimies, P. Steinbach, C. Richert, A.E. Goetz,
Targeting of the tumor microcirculation by photodynamic therapy with a synthetic porphycene, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 40, 305 (1997).
- [AW00] A.A. Abdel-Shafi, F. Wilkinson,
Charge Transfer Effects on the Efficiency of Singlet Oxygen Production Following Oxygen Quenching of Excited Singlet and Triplet States of Aromatic Hydrocarbons in Acetonitrile, *J. Phys. Chem. A* 104, 5747 (2000).
- [B01a] W. Bäumler,
Light sources for photodynamic therapy, in:
P. Calzavara-Pinton, R.-M. Szeimies, B. Ortel (Edts.),
Photodynamic Therapy and Fluorescence Diagnosis in Dermatology, Kap. 6, Elsevier, Amsterdam (2001).
- [B01b] Kristian Berg,
Basic principles of 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy, in:
P. Calzavara-Pinton, R.-M. Szeimies, B. Ortel (Edts.),
Photodynamic Therapy and Fluorescence Diagnosis in Dermatology, Kap. 8, Elsevier, Amsterdam (2001).
- [B76] D. Belluš,
Quenchers of singlet oxygen — a critical review, in:
Rånby, Rabek,
Singlet oxygen, reactions with organic compounds and polymers, S. 61, Wiley & Sons, Chichester (1978).
- [B98] Boehringer GmbH, Mannheim, Biochemica (1998).
- [BAK99] W. Bäumler, C. Abels, S. Karrer, T. Weiß, H. Messmann, M. Landthaler, R.-M. Szeimies,
Photo-oxidative killing of human colonic cancer cells using indocyanine green and infrared light, *Brit. J. Canc.* 80, 360 (1999).
- [BBC85] J.G. Banks, R.G. Board, J. Carter, A.D. Dodge,
The cytotoxic and photodynamic inactivation of micro-organisms by Rose Bengal, *J. Appl. Bacteriol.* 58, 391 (1985).

- [BCG95] M. Bossa, E. Cervone, C. Garzillo, G. Del Re,
On the electronic states of the extended porphyrin family,
J. Mol. Struct. (Theochem) 342, 73 (1995).
- [BEF01] F. Böhm, R. Edge, S. Foley, L. Lange, T. G. Truscott,
Antioxidant inhibition of porphyrin-induced cellular phototoxicity, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 65, 177 (2001).
- [BES87] H. Baumgärtl, A. M. Ehrly, K. Saeger-Lorenz, D. W. Lübbers,
Initial results of intracutaneous measurements of PO₂ profiles, in:
A. M. Ehrly, J. Hauss, R. Huch (Eds.),
Clinical oxygen pressure measurement, Springer-Verlag, Berlin (1987).
- [BG87] Q. A. Blan, L. I. Grossweiner,
Singlet oxygen generation by furocoumarins: Effect of DNA and liposomes,
Photochem. Photobiol. 45, 177 (1986).
- [BGK99] M. Berneburg, S. Grether-Beck, V. Kürten, T. Ruzicka, K. Briviba, H. Sies,
J. Krutmann
Singlet Oxygen Mediates the UVA-induced Generation of the Photoaging-associated Mitochondrial Common Deletion, *J. Biol. Chem.* 274, 15345 (1999).
- [BK92] A. Baker, J. R. Kanofsky,
Quenching of singlet oxygen by biomolecules from L1210 leukemia cells,
Photochem. Photobiol. 55, 523 (1992).
- [BKC98] P. Bilski, B. M. Kukielczak, C. F. Chignell,
Photoproduction and direct spectral detection of singlet molecular oxygen (¹O₂) in keratinocytes stained with rose bengal, *Photochem. Photobiol.* 68, 675 (1998).
- [BLC91] P. Bilski, A. S. W. Li, C. F. Chignell,
The photo-oxidation of N,N-Diethylhydroxylamine by rose bengal in acetonitrile and water, *Photochem. Photobiol.* 54(3), 345 (1991).
- [BLS78] R. V. Bensasson, E. J. Land, C. Salet,
Triplet excited state of furocoumarins: reactions with nucleic acids and amino acids, *Photochem. Photobiol.* 27, 273 (1978).
- [BLT94] R. V. Bensasson, E. J. Land, T. G. Truscott,
Excited States and Free Radicals in Biology and Medicine, Oxford University Press, Kap. 2, Oxford, New York, Tokio (1993).
- [BME02] D. Baumer, M. Maier, R. Engl, R.-M. Szeimies, W. Bäuml,
Singlet oxygen generation by 9-acetoxy-2,7,12,17-tetrakis-(b-methoxyethyl)-porphycene (ATMPn) in solution, *Chem. Phys.* 285, 309 (2002).

- [BMM97] S.E. Braslavsky, M. Müller, D.O. Mártire, S. Pörting, S.G. Bertolotti, S. Chakravorti, G. Koç-Weier, B. Knipp, K. Schaffner, Photophysical properties of porphycene derivatives (18π porphyrinoids), *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 40, 191 (1997).
- [BS84] E. Ben-Hur, P. Song, The photochemistry and photobiology of furocoumarins (psoralens), *Adv. Rad. Biol.* 11, 131 (1984).
- [BT93] S. Basu-Modak, R. M. Tyrrell, Singlet oxygen: a primary effector in the ultraviolet A/near-visible light induction of the human heme oxygenase gene, *Cancer Res.* 53(19), 4505 (1993).
- [C66] J. H. Carpenter, New measurements of oxygen solubility in pure and natural water, *Limnol. Oceanogr.* 11, 264 (1966).
- [CAM77] S. J. Chantrell, C. A. McAuliffe, R. W. Munn, A. C. Pratt, E. J. Land, Excited states of protoporphyrin IX dimethyl ester: reactions of the triplet with carotenoids, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. I* 73, 858 (1977).
- [CBR83] M. Craw, R. V. Bensasson, J. C. Ronfard-Haret, M. T. Sá e Melo, T. G. Truscott, Some photophysical properties of 3-carbethoxypsoralen, 8-methoxypsoralen and 5-methoxypsoralen triplet states, *Photochem. Photobiol.* 37, 611 (1983).
- [D53] D. L. Dexter, A theory of sensitized luminescence in solids, *J. Chem. Phys.* 21, 836 (1953).
- [D73] T. J. Dougherty, Photoradiation therapy, in: Abstracts of the American Chemical Society Meeting, Chicago, Il. (1973).
- [D92] J. A. Dean, Lange's handbook of chemistry, McGraw-Hill, Inc., New York (1992).
- [DGH98] T. J. Dougherty, C. J. Gomer, B. W. Henderson, G. Jori, Photodynamic Therapy, *J. Natl. Cancer Inst.* 90, 889 (1998).
- [DH91] M. D. Daniell, J. S. Hill, A History of Photodynamic Therapy, *Aust. N. Z. J. Surgery* 61, 340 (1991).
- [DKG78] T. J. Dougherty, J. E. Kaufman, A. Goldfarb, K. R. Weishaupt, D. Boyle, A. Mittelman, Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors, *Cancer Res.* 38, 2628 (1978).

- [DLJ99] A. P. Darmanyan, W. Lee, W. S. Jenks,
Charge Transfer Interactions in the Generation of Singlet Oxygen $O_2(^1\Delta_g)$
by Strong Electron Donors, *J. Phys. Chem. A* 103, 2705 (1999).
- [E94] G. H. Elder,
The porphyrias, in:
J. B. Holton (Ed.),
The inherited metabolic disorders, S. 351-78, Churchill Livingston, London
(1994).
- [EAF98] B. Ehrenberg, J. L. Anderson, C. S. Foote,
Kinetics and yield of singlet oxygen photosensitized by hypericin in organic
and biological Media, *Photochem. Photobiol.* 68, 135 (1998).
- [EKM02] R. Engl, R. Kilger, M. Maier, K. Scherer, C. Abels, W. Bäumler
Singlet Oxygen Generation by 8-Methoxypsoralen in Deuterium Oxide: Re-
laxation Rate Constants and Dependence of the Generation Efficacy on the
Oxygen Partial Pressure, *J. Phys. Chem. B* 106, 5776 (2002).
- [ES01] A. M. Edwards, E. J. Silva,
Effect of visible light on selected enzymes, vitamins and amino acids, *Photochem. Photobiol. B: Biol.* 63, 126 (2001).
- [ET76] D. F. Evans, J. N. Tucker,
Reactivity of the $(^1\Delta_g)_2$ and $(^1\Delta_g)$ states of oxygen produced by direct laser
excitation, *J. Chem. Soc. Farad. Trans.* 272, 1661 (1976).
- [F48] T. Förster,
Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz, *Ann. Physik* 2, 55
(1948).
- [F59] T. Förster,
Transfer mechanisms of electronic excitation, *Disc. Faraday Soc.* 27, 7
(1959).
- [F91] C. S. Foote,
Definition of Type I and Type II photosensitized Oxidation, *Photochem. Photobiol.* 54, 659 (1991).
- [FAK99] S. Fickweiler, C. Abels, S. Karrer, W. Bäumler, M. Landthaler, F. Hofstädter,
R.-M. Szeimies,
Photosensitization of human cell lines by ATMPn (9-acetoxy-2,7,12,17-tetrakis-(β -methoxyethyl)-porphycene) in vitro: mechanism of action,
J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 48, 27 (1999).

- [FSB97] S. Fickweiler, R.-M. Szeimies, W. Bäumler, P. Steinbach, S. Karrer, A. E. Goetz, C. Abels, F. Hofstädter, M. Landthaler, Indocyanine green: Intracellular uptake and phototherapeutic effects in vitro, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 38, 178 (1997).
- [FWM48] F. H. J. Figge, G. S. Weiland, L. J. Manganiello, Cancer detection and therapy, affinity of neoplastic, embryonic and traumatized tissues for porphyrins and metalloporphyrins, *Proc. Exp. Biol. Med.* 68, 640 (1948).
- [G94a] L. I. Grossweiner, The science of phototherapy, Kap. 4, 8, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida/USA (1994).
- [G94b] F. P. Gasparro, Extracorporeal photochemotherapy: Clinical aspects and the molecular basis for efficacy, S. 13, R.G. Landes Company, Austin (1994).
- [GKP73] O. L. J. Gijzeman, F. Kaufman, G. Porter, Oxygen Quenching of Aromatic Triplet States in Solution, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2* 69, 708 (1973).
- [GLV83] E. Gandin, Y. Lion, A. van de Vorst Quantum yield of singlet oxygen production by xanthene derivatives, *Photochem. Photobiol.* 37, 271 (1983).
- [GS64] K. Gollnik, G. O. Schenck, Mechanism and stereoselektivty of photosensitized oxygen transfer reactions, *Pure Appl. Chem.* 9, 507 (1964).
- [H01] S. Habeker, Darstellung der Lokalisation von Fluoreszenzfarbstoffen *in vitro*, Diplomarbeit, Universität Regensburg, Kap. 2,(2001).
- [H11] W. Hausmann, Die sensibilisierende Wirkung des Hämatoporphyrins, *Biochem. Z.* 30, 276 (1911).
- [H50] G. Herzberg, Molecular Spectra and molecular structure, I. Spectra of diatomic molecules, 2nd ed., Van Nostrand, New York, Kap. III, V u. VIII (1950).
- [H67] M. Hercher, An Analysis of Saturable Absorbers, *Appl. Opt.* 6, 947 (1967).

- [HC87] R. D. Hall, C. F. Chignell,
Steady-state near-infrared detection of singlet molecular oxygen: A Stern-Vollmer quenching experiment with sodium azide, *Photochem. Photobiol.* 45, 459 (1987).
- [HCN01] D. W. C. Hunt, P. M. Curry, J. R. North,
Immunologic actions of PDT, in:
P. Calzavara-Pinton, R.-M. Szeimies, B. Ortel (Edts.),
Photodynamic Therapy and Fluorescence Diagnosis in Dermatology, Kap. 5,
Elsevier, Amsterdam (2001).
- [HLL97] J. He, H. E. Larkin, Y.-S. Li, B. D. Rither, S. I. A. Zaidi, M. A. J. Rodgers,
H. Mukhtar, M. E. Kenney, N. L. Oleinick,
The synthesis, photophysical and photobiological properties and in vitro
structure-activity relationships of a set of silicone phthalocyanine PDT pho-
tosensitizers, *Photochem. Photobiol.* 65, 581 (1997).
- [HLM82] W. Hoppe, W. Lohmann, H. Markl, H. Ziegler (Hrsgb.),
Biophysik, Ein Lehrbuch, 2. Aufl., Kap. 12, Springer-Verlag, Berlin, Heidel-
berg, New York (1982).
- [HMP98] W. Holzer, M. Mauerer, A. Penzkofer, R.-M. Szeimies, C. Abels,
M. Landthaler, W. Bäumlner,
Photostability and thermal stability of indocyanine green, *J. Photo-
chem. Photobiol. B: Biol.* 47, 155 (1998).
- [HW98] H. Haken, H. C. Wolf,
Molekülphysik und Quantenchemie, 3. Aufl., Kap. 13, Springer-Verlag, Ber-
lin, Heidelberg, New York (1998).
- [HWS89] G. M. J. Beijersbergen van Henegouwen, E. T. Wijn, S. A. Schoonderwoerd,
H. de Vries,
Singlet oxygen mediated photobinding of 8-methoxypsoralen to DNA and
genotoxicity in *E. coli*, *Z. Naturforsch.* 44c, 819 (1989).
- [IMM95] V. Iani, J. Moan, L. W. Ma,
Measurements of light penetration into human tissues in vivo, *SPIE
Proc.* 2625, 339 (1995).
- [JG94] L. R. Jones, L. I. Grossweiner,
Singlet oxygen generation by Photofrin® in homogeneous and light-
scattering media, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 26, 249 (1994).
- [JP83] P. C. Joshi, M. A. Pathak,
Production of singlet oxygen and superoxide radicals by psoralens and their
biological significance, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 112, 638 (1983).

- [JYT93] S. G. Jones, A. R. Young, T. G. Truscott,
Singlet oxygen yields of furocoumarins and related molecules – the effect of
excitation wavelength, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 21, 223 (1993).
- [K01] R. Kilger,
Untersuchung der Relaxation von Photofrin-generiertem Singulett-
Sauerstoff in Lösungen und *in vitro*, Dissertation, Universität Regensburg,
Kap. 6 (2001).
- [K71] D. R. Kearns,
Physical and chemical properties of singlet molecular oxygen, *Chem. Rev.*
71, 395 (1971).
- [K72] P. H. Krupenie,
The spectrum of molecular oxygen, *J. Chem. Phys. Ref. Data* 1, 424 (1972).
- [K81] I. E. Kochevar,
Phototoxicity mechanisms: Chlorpromazine-photosensitized damage to
DNA and cell membranes, *J. Invest. Dermatol.* 76, 59 (1981).
- [K84] D. Kessel,
Hematoporphyrin and HpD: photophysics, photochemistry and photothera-
py, *Photochem. Photobiol.* 36, 851 (1984).
- [K85] M. Kasha,
Singlet oxygen electronic structure and energy transfer, in:
A. A. Frimer (Ed.),
Singlet O₂, Vol. I to Vol. IV, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida/USA
(1985).
- [K91] J. R. Kanovsky,
Quenching of singlet oxygen by human red cell ghosts, *Photochem. Photo-
biol.* 53, 93 (1991).
- [KAB97] S. Karrer, W. Bäumler, M. Steinbauer, M. Landthaler, R.-M. Szeimies,
Photochemotherapie kutaner Rektumkarzinom-Metastasen mit Indozyanin-
grün, *Dtsch. Med. Wschr.* 122, 1111 (1997).
- [KB67] K. Kayama, J. C. Baird,
Spin-orbit effects and the fine structure in the $^3\Sigma_g^-$ ground state of O₂,
J. Chem. Phys. 46, 2604 (1967).
- [KLT86] C. N. Knox, E. J. Land, T. G. Truscott,
Singlet oxygen generation by furocoumarin triplet states – I. Linear furo-
coumarins (psoralens), *Photochem. Photobiol.* 43, 359 (1986).

- [KMS01] R. Kilger, M. Maier, R.-M. Szeimies, W. Bäumler,
Bidirectional energy transfer between the triplet T_1 state of photofrin and
singlet oxygen in deuterium oxide, *Chem. Phys. Lett.* 343, 543 (2001).
- [KPB83] R. Klotz, S. D. Peyerimhoff, R. J. Buenker,
Verh. DPG, FACHSITZ M-XIV, Vortrag M74 (1983).
- [KPP90] J. C. Kennedy, R. H. Pottier, D. C. Pross,
Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles
and present clinical experience, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 6, 143
(1990).
- [KSE86] A. A. Krasnovsky, V. L. Sukhorukov, S. Yu. Egorov, A. Ya. Potapenko, Gene-
ration and quenching of singlet molecular oxygen by furocoumarins. Direct
measurements, *Stud. Biophys.* 114, 149 (1986).
- [KSE97] S. Karrer, R.-M. Szeimies, A. Ebert, S. Fickweiler, C. Abels, W. Bäumler,
M. Landthaler,
Dose-dependent Photodynamic Effects of 9-acetoxy-2,7,12,17-tetrakis-(β -
methoxyethyl)-porphycene In Vitro, *Las. Med. Sci.* 12, 307 (1997).
- [KT80] M. C. Kavanaugh, R. R. Trussell,
Design of aeration towers to strip volatile contaminations from drinking
water, *J. Am. Water Works Assoc.* 72, 684 (1980).
- [L28] A. G. Loomis,
Solubilities of gases in water (1928), in:
E. W. Washburn, C. J. West, N. E. Dorsey, F. R. Bichowsky, A. Klemenc,
editors,
International critical tables of numerical data, physics, chemistry and tech-
nology Vol. III, S. 255, McGraw Hill, Inc., New York (1928).
- [L86] G. Laustriat,
Molecular mechanisms of photosensitization, *Biochimie* 68, 771 (1986).
- [LAS82] M. K. Logani, W. A. Austin, B. Shah, R. E. Davies,
Photooxidation of 8-methoxypsoralen with singlet oxygen, *Photochem. Pho-
tobiol.* 35, 569 (1982).
- [LB62] Landolt-Börnstein,
Zahlenwerte und Funktionen aus Physik, II. Band Eigenschaften der Mate-
rie in ihren Aggregatzuständen, 5. Teil Transportphänomene I, Bandteil a,
Springer Verlag, Berlin, S. 196, 209 (1962).
- [LBG88] A. P. Losev, L. M. Byteva, G. P. Gurinovich,
Singlet oxygen luminescence quantum yields in organic solvents and water,
Chem. Phys. Lett. 143, 127 (1988).

- [LDF99] J. M. Larkin, W. R. Donaldson, T. H. Foster, R. S. Knox,
Reverse intersystem crossing from a triplet state of rose bengal populated
by sequential 532- + 1064-nm laser excitation, *Chem. Phys.* 244, 319 (1999).
- [LF95] D. R. Linde and H. P. R. Frederikse, editors,
CRC Handbook of Chemistry and Physics, 76th Ed., CRC Press, Inc., Boca
Raton, Florida/USA (1995).
- [LK96] C. R. Lambert, I. E. Kochevar,
Does Rose Bengal create superoxide anion?, *J. Am. Chem. Soc.* 118, 3297
(1996).
- [LK97] C. R. Lambert, I. E. Kochevar,
Electron Transfer Quenching of the Rose Bengal Triplet State, *Photo-
chem. Photobiol.* 66, 15 (1997).
- [LR87] P. C. C. Lee, M. A. J. Rodgers,
Laser flash photokinetic studies of Rose Bengal sensitized photodynamic
interactions of nucleotides and DNA, *Photochem. Photobiol.* 45, 79 (1987).
- [LRD83] D. Lichtenberg, R. J. Robson, E. A. Dennis,
Solubilization of phospholipids by detergents, *Biochim. Biophys. Acta* 737,
285 (1983).
- [LST90] C. R. Lambert, T. Sarna, T. G. Truscott,
Rose Bengal Radicals and their Reactivity, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 86,
3879 (1990).
- [M13] F. Meyer-Betz,
Untersuchungen über die biologische (photodynamische) Wirkung des Hä-
matoporphyrins und andere Derivate des Blut- und Gallenfarbstoffes,
Dtsch. Arch. Klin. Med. 112, 476 (1913).
- [M86] G. Moreno,
Photosensitization of mammalian cells by psoralens and porphyrins, *Biochi-
mie* 68, 869 (1986).
- [M90] J. Moan,
Properties for optimal PDT sensitizers, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 5,
521 (1990).
- [M93] J. G. Moser,
Attempts to treat malignant melanoma by photodynamic therapy using
bacteriopheophorbide ester as the sensitizer, *SPIE Proc.* 1881, 116 (1993).

- [MAB79] M. T. Sa e Melo, D. Averbek, R. V. Benasson, E. J. Land, C. Salet, Some furocoumarins and analogs: Comparison of triplet properties in solution with photobiological activities in yeast, *Photochem. Photobiol.* 30, 645 (1979).
- [MH73] W. J. Moore, D. O. Hummel, *Physikalische Chemie*, 1. Aufl., Walter de Gruyter, Berlin, New York, Kap. 7 u. 8 (1973).
- [MK72] P. B. Merkel and D. R. Kearns, Radiationless decay of singlet molecular oxygen in solution. An experimental and theoretical study of electronic-to-vibrational energy transfer, *J. Am. Chem. Soc.* 94, 7244 (1972).
- [MMK96] J. G. Moser, F.-P. Montforts, D. Kusch, A. Vervoorts, D. Kirsch, M. Berg-hahn, N. Akgün, A. Rück, S. Andrees, B. Wagner, How many molecules of a photosensitizer are necessary to photosensitize a tumor cell, *SPIE Proc.* 2924, 22 (1996).
- [MO01] A. C. E. Moor, B. Ortel, Mechanisms of action – molecular effects, in: P. Calzavara-Pinton, R.-M. Szeimies, B. Ortel (Edts.), *Photodynamic Therapy and Fluorescence Diagnosis in Dermatology*, Kap. 3, Elsevier, Amsterdam (2001).
- [MPZ98] M. Mauerer, A. Penzkofer, J. Zweck, Dimerization, J-aggregation and J-disaggregation dynamics of indocyanine green in heavy water, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 47, 68 (1998).
- [MR69] L. Musajo and G. Rodighiero, Studies on the photo-c₄-cyclo-addition reactions between skin-photosensitizing furocoumarins and nucleic acids, *Photochem. Photobiol.* 11, 27 (1970).
- [MRM88] J. Moan, C. Rimington, Z. Malik, Photoinduced degradation and modification of Photofrin II in cells *in vitro*, *Photochem. Photobiol.* 47, 363 (1988).
- [MSK82] G. Moreno, Ch. Salet, C. Kohen, E. Kohen, Penetration and localization of furocoumarins in single living cells studied by microspectrofluorometry, *Biochim. Biophys. Acta* 721, 109 (1982).
- [MWS97] A. Morita, T. Werfel, H. Stege, C. Ahrens, K. Karmann, M. Grewe, S. Grether-Beck, T. Ruzicka, A. Kapp, L.-O. Klotz, H. Sies, J. Krutmann, Evidence that Singlet Oxygen-induced Human T Helper Cell Apoptosis Is the Basic Mechanism of Ultraviolet-A Radiation Phototherapy, *J. Exp. Med.* 186, 1763 (1997).

- [N89] D. C. Neckers,
Rose Bengal, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 47, 1 (1989).
- [NMK72] R. Niesson, P. B. Merkel, D. R. Kearns,
Unambiguous evidence for the participation of singlet oxygen ($^1\Delta$) in photodynamic oxydation of amino acids, *Photochem. Photobiol.* 16, 117 (1972).
- [NPW02] M. Niedre, M. S. Patterson, B. C. Wilson,
Direct near-infrared luminescence detection of singlet oxygen generated by photodynamic therapy in cells in vitro and tissues in vivo, *Photochem. Photobiol.* 75, 382 (2002).
- [O97] M. Ochsner,
Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumors, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 39, 1 (1997).
- [O98] P. Ott,
Hepatic Elimination of Indocyanine Green with Special Reference to Distribution Kinetics and the Influence of Plasma Protein Binding, *Pharmacol. Toxicol.* 83 Suppl. II, 1 (1998).
- [OF83] P. R. Ogilby, C. S. Foote,
Chemistry of singlet oxygen, *J. Am. Chem. Soc.* 105, 3423 (1983).
- [OSH97] S. Oelckers, M. Szczepan, T. Hanke, B. Röder,
Time-resolved detection of singlet oxygen luminescence in red cell ghost suspensions, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 39, 219 (1997).
- [OZM99] S. Oelckers, T. Ziegler, I. Michler, B. Röder,
Time-resolved detection of singlet oxygen luminescence in red cell ghost suspensions: concerning a signal component that have been attributed to $1O_2$ luminescence from the inside of a native membrane, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 53, 121 (1999).
- [P01a] Q. Peng,
Correlation of intracellular and intratumoral photosensitizer distribution with photodynamic effect, in:
P. Calzavara-Pinton, R.-M. Szeimies, B. Ortel (Edts.),
Photodynamic Therapy and Fluorescence Diagnosis in Dermatology, Kap. 4, Elsevier, Amsterdam (2001).
- [P01b] PreSens GmbH, Regensburg,
Handbuch für Microx TX VP 1.0, Anhang (2001).
- [P78] W. A. Pryor,
The formation of free radicals and the consequences of their reactions in vivo, *Photochem. Photobiol.* 28, 787 (1978).

- [P91] A. Ya. Potapenko,
Mechanisms of photodynamic effects of furocoumarins, J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 9, 1 (1991).
- [P94] W. Pschyrembel (Hrsgb.),
Klinisches Wörterbuch, 257. Auflage, Nikol Verlagsgesellschaft mbH, Hamburg (1994).
- [PFT74] J. A. Parrish, T. B. Fitzpatrick, L. T. Tanenbaum, M. A. Pathak,
Photochemotherapy of psoriasis with oral methoxsalen and longwave ultraviolet light, N. Engl. J. Med. 291, 1207 (1974).
- [PJ84] M. A. Pathak, P. C. Joshi,
Production of active oxygen species ($^1\text{O}_2$ and O_2^-) by psoralens and ultraviolet radiation (320–400 nm), Biochim. Biophys. Acta 798, 115 (1984).
- [PMW90] M. S. Patterson, S. J. Madsen, B. C. Wilson,
Experimental tests of the feasibility of singlet oxygen luminescence monitoring *in vivo* during photodynamic therapy, J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 5, 69 (1990).
- [PPB96] R. Philip, A. Penzkofer, W. Bäuml, R. M. Szeimies, C. Abels,
Absorption and fluorescence spectroscopic analysis of indocyanine green, J. Photochem. Photobiol. A: Chem. 96, 137 (1996).
- [PS84] J. G. Parker, W. D. Stanbro,
Dependence of photosensitized singlet oxygen production on porphyrin structure and solvent, in: Porphyrin Localization and Treatment of Tumors, S. 259–284, Alan R. Liss, Inc. (1984).
- [PT86] R. Pottier, T. G. Truscott,
The photochemistry of haematoporphyrin and related systems, Int. J. Radiat. Biol. 50, 421 (1986).
- [PV79] J. P. Pooler, D. P. Valenzo,
The role of singlet oxygen in photooxidation of excitable cell membranes, Photochem. Photobiol. 30, 581 (1979).
- [QQG89] R. Quint, R. M. Quint, N. Getoff, T. Gantchev, M. Shopova,
Flash Photolysis and ESR Studies on Hematoporphyrin and Photofrin II in Polar and Microheterogeneous Environment, Z. Naturforsch. 44a, 283 (1989).
- [R00] O. Raab,
Ueber die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusoria, Z. Biol. 39, 524 (1900).

- [R91] R. W. Redmond,
Enhancement of the sensitivity of radiative and non-radiative detection techniques in the study of photosensitization by water soluble sensitizers using a reverse micelle system, *Photochem. Photobiol.* 54, 547 (1991).
- [RBP87] N. Razum, O. J. Balchum, A. E. Profio, F. Carstens,
Skin photosensitivity: Duration and intensity following intravenous hematoporphyrin derivatives HpD and DHE, *Photochem. Photobiol.* 46, 925 (1987).
- [RCK95] M. Rózanowska, J. Ciszewska, W. Korytowski, T. Sarna,
Rose-bengal-photosensitized formation of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 29, 71 (1995).
- [RF62] G. W. Robinson, R. P. Frosch,
Theory of Electronic Energy Relaxation in the Solid Phase, *J. Chem. Phys.* 37, 1962 (1962).
- [RF63] G. W. Robinson, R. P. Frosch,
Electronic Excitation Transfer and Relaxation, *J. Chem. Phys.* 38, 1187 (1963).
- [RP96] S. Reindl, A. Penzkofer,
Triplet quantum yield determination by picosecond laser double-pulse fluorescence excitation, *Chem. Phys.* 213, 429 (1996).
- [RPG97] S. Reindl, A. Penzkofer, S.-H. Gong, M. Landthaler, R.-M. Szeimies, C. Abels, W. Bäuml,
Quantum yield of triplet formation for indocyanine green, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 105, 65 (1997).
- [RWF55] D. S. Rassmussen-Taxdal, G. E. Ward, F. H. J. Figge,
Fluorescence of human lymphatic and cancer tissues following high doses of intravenous hematoporphyrin, *Cancer* 8, 78 (1955).
- [S03] R. Schraml, Untersuchung des laser-induzierten Abbaus von Indocyaningrün (ICG), Zulassungsarbeit, Universität Regensburg (2003).
- [S98] Sanofi Pharmaceuticals, Inc., Photofrin (porfimer sodium), Medikamentenpackungsbeilage (1998).
- [S99] R. Sander,
Compilation of Henry's Law constants for inorganic and organic species of potential importance in environmental chemistry (Version 3), <http://www.mpch-mainz.mpg.de/~sander/res/henry.html> (1999).

- [SAB79] M. T. Sá e Melo, D. Averbek, R. V. Bensasson, E. J. Land, C. Salet, Some furocoumarins and analogs: comparison of triplet properties in solution with photobiological activities in yeast, *Photochem. Photobiol.* 30, 645 (1979).
- [SB93] R. Schmidt, M. Bodesheim, Efficiencies of $O_2(^1\Sigma_g^+)$ and $O_2(^1\Delta_g)$ formation in the primary steps of triplet state photosensitization, *Chem. Phys. Lett.* 213, 111 (1993).
- [SCR02] L. M. Scolaro, M. Castriciano, A. Romeo, S. Patanè, E. Cefalì, M. Allegrini, Aggregation Behavior of Protoporphyrin IX in Aqueous Solution: Clear Evidence of Vesicle Formation, *J. Phys. Chem. B* 106, 2453 (2002).
- [SD95] A. Srivastava, S. Doraiswamy, Rotational diffusion of rose bengal, *J. Chem. Phys.* 103, 6197 (1995).
- [SDA01] R.-M. Szeimies, J. Dräger, C. Abels, M. Landthaler, History of photodynamic therapy in dermatology, in: P. Calzavara-Pinton, R.-M. Szeimies, B. Ortel (Edts.), *Photodynamic Therapy and Fluorescence Diagnosis in Dermatology*, Kap. 1, Elsevier, Amsterdam (2001).
- [SFS01] R. Schmidt, F. Shafii, C. Schweitzer, A. A. Abdel-Shafi, F. Wilkinson, Charge-transfer and non-charge-transfer processes competing in the sensitization of singlet oxygen: Formation of $O_2(^1\Sigma_g^+)$, $O_2(^1\Delta_g)$, $O_2(^3\Sigma_g^-)$ during oxygen quenching of triplet excited naphthalene derivatives, *J. Phys. Chem. A* 105, 1811 (2001).
- [SG68] B. I. Stepanov, V. P. Gribkovskii, Theory of luminescence, Iliffe Books (Engl. Ed.) (1968).
- [SG78] G. Schneidermann, T. K. Goldstick, The oxygen electrode design criteria and performance characteristics: recessed cathode, *J. Appl. Physiol.* 45, 145 (1978).
- [SKA96] R.-M. Szeimies, S. Karrer, C. Abels, P. Steinbach, S. Fickweiler, H. Messmann, W. Bäuml, M. Landthaler, 9-acetoxy-2,7,12,17-tetrakis-(β -methoxyethyl)-porphycene (ATMPn), a novel photosensitizer for photodynamic therapy: uptake kinetics and intracellular localization, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 34, 67 (1996).
- [SL94] R.-M. Szeimies, M. Landthaler, Mit Licht gegen Krebs, *Blick in die Wissenschaft* 5, 22 (1994).
- [SNT99] U. Schmidt-Erfurth, J. Noak, S. Tescher, R. Birngruber, Konfokale Indozyanin-Grün-Angiographie mit dreidimensionaler Topographie, *Ophthalmologie* 96, 797 (1999).

- [SPW78] V. S. Srinivasan, D. Podolski, N. J. Westrick, D. C. Neckers,
Photochemical Generation of O_2^- by Rose Bengal and $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$,
J. Am. Chem. Soc. 100, 6513 (1978).
- [SS01] R. Schmidt, F. Shafi,
Influence of Charge Transfer Interactions on the Sensitization of Singlet
Oxygen: Formation of $\text{O}_2(^1\Sigma_g^+)$, $\text{O}_2(^1\Delta_g)$, and $\text{O}_2(^3\Sigma_g^-)$ during Oxygen Quen-
ching of Triplet Excited Biphenyl Derivatives, J. Phys. Chem. A 105, 8871
(2001).
- [SSF00] M. Schäfer, C. Schmitz, R. Facius, G. Horneck, B. Milow, K.-H. Funken,
J. Ortner,
Systemic Study of Parameters Influencing the Action of Rose Bengal with
Visible Light on Bacterial Cell: Comparison between the Biological Effect
and Singlet Oxygen Production, Photochem. Photobiol. 71, 514 (2000).
- [STP96] H. Stiel, K. Teuchner, A. Paul, D. Leupold, I. E. Kochevar,
Quantitative comparison of excited state properties and intensity-dependent
photosensitization by Rose Bengal, J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 33,
245 (1996).
- [STT80] R. S. Sinclair, D. Tait, T. G. Truscott,
Triplet States of Protoporphyrin IX and Protoporphyrin IX Dimethyl
Esther, J. C. S. Faraday I, 76, 417 (1980).
- [STT99] M. M. Siegel, K. Tabei, R. Tsao, M. J. Pastel, R. K. Pandey, S. Berkenkamp,
F. Hillenkamp, M. S. de Vries,
Comparative Mass Spectrometric Analyses of Photofrin Oligomers by Fast
Atom Bombardement Mass Spectrometry, UV and IR Matrix-assisted La-
ser Desorption/Ionization Mass Spectrometry, Electrospray Ionization Mass
Spectrometry and Laser Desorption/Jet-cooling Photoionization Mass Spec-
trometry, J. Mass Spectrom. 34, 661 (1999).
- [SZ91] T. Sarna, J. Zając, M. K. Bowman, T. G. Truscott,
Photoinduced electron transfer reactions of rose bengal and selected electron
donors, J. Photochem. Photobiol. A: Chem. 60, 295 (1991).
- [SZY89] T. Shen, Z.-G. Zhao, Q. Yu, H.-J. Xu,
Photosensitized reduction of benzil by heteroatom containing anthracene
dyes, J. Photochem. Photobiol. A: Chem. 47, 203 (1989).
- [T09] H. von Tappheimer,
Die photodynamische Erscheinung, Ergebn. Physiol. 8, 698 (1909).

- [T78] N. J. Turro,
Modern Molecular Photochemistry, Kap. 9, The Benjamin/Cummings Publishing Co., Inc., Menlo Park (California), Reading (Massachusetts), London, Amsterdam, Don Mills (Ontario), Sydney (1978).
- [TJ03] H. von Tappheimer, A. Jesionek,
Therapeutische Versuche mit fluoreszierenden Stoffen, Münch. Med. Wochenschr. 47, 2042 (1903).
- [TJ07] H. von Tappheimer, A. Jodlbauer,
Die Sensibilisierende Wirkung Fluoreszierender Substanzen. Gesammelte Untersuchungen ueber die Photodynamische Erscheinung, FCW Vogel, Leipzig (1907).
- [TSM01] C. Tanielian, C. Schweitzer, R. Mechin, C. Wolff,
Quantum yield of singlet oxygen production by monomeric and aggregated forms of hematoporphyrin derivative, Free Rad. Biol. Med. 30, 208 (2001).
- [V02] R. Vasold,
private Mitteilung (2002).
- [V90] K. P. C. Vollhardt,
Organische Chemie, 2nd Edition, VCH Verlag, Weinheim, p. 1267 (1990).
- [VKO89] P. Vaupel, F. Kallinowski, P. Okunieff,
Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review, Cancer Res. 49, 6449 (1989).
- [W62] W. R. Ware,
Oxygen quenching of fluorescence in solution: An experimental study of the diffusion processes, J. Phys. Chem. 66, 455 (1962).
- [W77] E. R. Wilhelm, R. Battino, R. J. Wilcock,
Low pressure solubility of gases in liquid water, Chem. Rev. 77, 219 (1977).
- [WA97] F. Wilkinson, A. A. Abdel-Shafi,
Mechanism of Quenching of Triplet States by Oxygen: Biphenyl Derivatives in Acetonitrile, J. Phys. Chem. A 101, 5509 (1997).
- [WA99] F. Wilkinson, A. A. Abdel-Shafi,
Mechanism of Quenching of Triplet States by Oxygen: Biphenyl Derivatives in Different Solvents, J. Phys. Chem. A 103, 5425 (1999).
- [WB82] H. H. Wasserman, D. R. Berdahl,
The photooxidation of 8-methoxypsoralen, Photochem. Photobiol. 35, 565 (1982).

- [WGD76] K. R. Weishaupt, C. J. Gomer, T. J. Dougherty,
Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photoinactivation
of a murine tumor, *Cancer Res.* 36, 2326 (1976).
- [WHR95] F. Wilkinson, W. P. Helman, A. B. Ross,
Rate constants for the decay and reactions of the lowest electronically exci-
ted states of molecular oxygen in solution. An expanded and revised com-
pilation, *J. Phys. Chem. Ref. Data* 24, 663 (1995).
- [WJL85] B. C. Wilson, W. P. Jeeves, D. M. Lowe,
In vivo and post mortem measurements of the attenuation spectra of light
in mamallian tissue, *Photochem. Photobiol.* 42(2), 153 (1985).
- [WO97] B. C. Wilson, M. Olivo,
Subcellular localization of Photofrin[®] and aminolevulinic acid and photo-
dynamic cross-resistance *in vitro* in radiation-induced fibrosarcoma cells
sensitive or resistant to Photofrin-mediated photodynamic therapy, *Pho-
tochem. Photobiol.* 65, 166 (1997).
- [YB76] R. H. Young, D. R. Brewer,
The mechanism of quenching of singlet oxygen (1976), in:
Rånby, Rabek,
Singlet oxygen, reactions with organic compounds and polymers, S. 36, Wi-
ley & Sons, Chichester (1978).
- [ZH71] O. Zamani-Kfamira, H. F. Hameka,
Spin-orbit contribution to the zero-field splitting of the oxygen molecule,
J. Chem. Phys. 55, 2191 (1971).
- [ZPC01] C. Zane, G. De Panfilis, P. Calzavara-Pinton,
Photosensitizers–systemic sensitization, in:
P. Calzavara-Pinton, R.-M. Szeimies, B. Ortel (Edts.),
Photodynamic Therapy and Fluorescence Diagnosis in Dermatology, Kap. 7,
Elsevier, Amsterdam (2001).

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mir während meiner Promotion zur Seite standen. Mein besonderer Dank gilt:

- Herrn Prof. Dr.rer.nat. M. Maier vom Institut für Experimentelle und Angewandte Physik der Universität Regensburg für die aufmerksame Betreuung meiner Arbeit sowie die ständige Bereitschaft zu hilfreicher Diskussion.
- Herrn Prof. Dr. med. M. Landthaler für die Aufnahme in der Klinik und Poliklinik für Dermatologie der Universität Regensburg.
- Herrn PD Dr. med. R.-M. Szeimies für die freundliche Aufnahme in der PDT-Arbeitsgruppe der Klinik und Poliklinik für Dermatologie.
- Herrn PD Dr. rer. nat. W. Bäumler von der Klinik und Poliklinik für Dermatologie des Klinikums der Universität Regensburg, der mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand.
- Herrn PD Dr. med. Ch. Abels, der durch seine bissigen, aber geistreichen Kommentare so manch wertvolle Diskussion anstiftete.
- Frau Doreen Sontag, MTA, nicht nur für die hervorragende Zusammenarbeit im Rahmen der *in vitro* Experimente.
- Allen weiteren Mitgliedern der PDT-Arbeitsgruppe von PD Dr. Szeimies sowie des Lehrstuhls von Prof. Dr. Maier für die jederzeit freundliche Unterstützung sowie ein Arbeitsklima zum Wohlfühlen.
- Meinen Eltern für deren Bereitschaft, Entbehrungen für mein Studium auf sich zu nehmen und die dadurch diese Arbeit erst ermöglicht haben.
- Zum Schluß, aber sicher nicht zuletzt, Frau Christina Falk, denn:

Die Frau, auf die es wirklich ankommt,
kann dein Leben retten.
Sie macht dich besser als du bist,
und gibt dir das Gefühl,
in den Himmel zu wachsen.
KEVIN COSTNER, 2002